



Caractérisation Structurale et Fonctionnelle de l'Aquaglycéroporine AQP3 exprimée dans divers Systèmes

Nathalie Roudier

► To cite this version:

Nathalie Roudier. Caractérisation Structurale et Fonctionnelle de l'Aquaglycéroporine AQP3 exprimée dans divers Systèmes. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2000. Français. <tel-00004048>

HAL Id: tel-00004048

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00004048>

Submitted on 22 Dec 2003

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE PARIS-SUD
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

THESE

Présentée

Pour obtenir

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

PAR

Nathalie ROUDIER

**CARACTERISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE
L'AQUAGLYCEROPORINE AQP3 EXPRIMEE DANS DIVERS SYSTEMES**

soutenue le 19 janvier 2000 devant la commission d'examen:

Andréas ENGEL	Pr. à l'Université de Bâle (Suisse)	Rapporteur
Alexandre GHAZI	DR CNRS à l'Univ. Paris XI-Orsay	Examineur
Marc LE MAIRE	DR CNRS au CEA Saclay	Examineur
Francis MARTY	Pr. à l'Université de Dijon	Rapporteur
Christophe MAUREL	CR CNRS Montpellier	Examineur
Pierre RIPOCHE	DR CEA au CEA Saclay	Directeur de Thèse

CEA/Saclay - Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire
Service de Biologie Cellulaire

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Service de Biologie Cellulaire du CEA de Saclay dirigé par Pierre RIPOCHE.

Je tiens à remercier:

-Pierre RIPOCHE, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, avoir suivi mon travail tout au long de ma thèse et m'avoir soutenue pendant les moments difficiles.

-Frédérique TACNET, pour m'avoir intégrée au laboratoire en ayant accepté de m'encadrer pendant un stage d'été et pendant mon DEA.

-Bernard ROSSIGNOL et Emmanuel SHECHTER, pour m'avoir accepté dans le DEA "Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés".

-Vincent LAIZE, pour m'avoir initiée aux bases de la biologie Moléculaire, je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité et son dévouement.

-Valérie LAGREE, Stéphane DESCHAMPS, Jean-François HUBERT, Pascal BAILLY, Patricia GERBEAU, Josette GUCLU, Christophe MAUREL et Mario PARISI avec lesquels des collaborations stimulantes ont été établies.

-Adrien BAZUREAU et Audrey DESBOUYS, mes stagiaires.

-Renée GOBIN, Véronique BERTHONAUD, Marie-Marcelle TRINH TRANG TAN, Germain ROUSSELET, Jean-Marc VERBAVATZ, Marie-Odile REUTER, Pascale FILOCHE, Céline BADIER, Christine LEROY NOURI, Jean MEROT, Sophie LE MAOUT, Marie-Bénédicte BARRAULT, Corinne LE MOAL, Sonia MARTIAL, Bénédicte ORIOU, Valérie MEYRIAL, Chanatl COLMONT, Sophie COMBET, Rachid SOUGRAT, Stéphanie MICHELET, Gilles BASSET, Dominique GUIVAR'CH et tous les autres membres du laboratoire, pour leur précieuse collaboration, leurs conseils, leur joie de vivre, leurs sourires ou leur soutien pendant les moments difficiles.

-Andréas ENGEL et Francis MARTY, pour avoir accepté de consacrer du temps pour juger ce travail, et pour s'être déplacé depuis Bâle et Dijon.

-Alexandre GHAZI, pour avoir accepté de faire partie du jury.

-Christophe MAUREL, pour avoir accepté de faire partie du jury, pour s'être déplacé depuis Montpellier, et pour l'aide apportée dans une partie de ce travail.

-Marc LE MAIRE, pour avoir accepté de présider ce jury et pour sa contribution dans l'amélioration de ce manuscrit grâce à ses critiques.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
ABREVIATIONS.....	9
PREFACE.....	11

PARTIE I. INTRODUCTION.....	13
------------------------------------	-----------

<u>CHAPITRE I.</u> INTRODUCTION GENERALE	15
---	-----------

I.A. DECOUVERTE DU PREMIER CANAL HYDRIQUE	16
--	-----------

I.B. LA FAMILLE DES PROTEINES MIPS	19
---	-----------

I.B.1. Les protéines MIPS de mammifères	19
---	----

I.B.2. Les protéines MIPS d'autres espèces	23
--	----

<u>CHAPITRE II.</u> STRUCTURE/FONCTION DES PROTEINES MIPS	25
--	-----------

II.A. AQP1: MODELE DE BASE POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES PROTEINES MIPS	25
---	-----------

II.A.1. Détermination de la structure tertiaire	25
---	----

II.A.1.a Profil d'hydropathie	25
-------------------------------------	----

II.A.1.b Modèle du sablier.....	27
---------------------------------	----

II.A.2. Purification à partir des globules rouges humains.....	30
--	----

II.A.3. Structures bi- et tridimensionnelles	32
--	----

II.B. LES MEMBRES DE LA FAMILLE MIP	36
--	-----------

II.B.1. Systèmes d'expression hétérologue.....	36
--	----

II.B.2. Controverses au sujet de la sélectivité	37
---	----

II.B.3. Controverses au sujet de la régulation	42
--	----

II.B.4. Comparaison des structures primaires	47
--	----

II.B.5. Indépendance des monomères d'AQP1	53
---	----

II.B.6. Implication de certains résidus dans la fonction, la structure ou l'adressage.....	54
--	----

II.B.7. Etude de l'organisation membranaire.....	58
--	----

II.C. AQP3, LA PREMIERE AQUAGLYCEROPORINE DONT LA STRUCTURE RESTE	
--	--

INCONNUE.	65
-----------------------	-----------

PARTIE II. PRESENTATION DES TRAVAUX66
--

OBJECTIF DES ETUDES PRESENTEES DANS LES CHAPITRES SUIVANTS ...68

CHAPITRE III. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'AQP3 DANS LES GLOBULES ROUGES HUMAINS70

III.A. INTRODUCTION..... 70

III.B. MATERIELS ET METHODES..... 72

III.B.1. Mesure de P_f et transport de glycérol par spectrophotométrie à flux interrompu 72

III.B.1.a Préparation des globules rouges 72

III.B.1.b Principe du spectrophotomètre à flux interrompu 72

III.B.1.c Calcul de P_f 74

III.B.1.d Calcul de la constante de vitesse d'entrée de glycérol 75

III.B.1.e Inhibition des flux d'eau et de glycérol..... 75

III.B.2. Mesure de la perméabilité au glycérol des globules rouges 76

III.B.2.a Préparation des fantômes d'hématies..... 76

III.B.2.b Transport de ^{14}C -glycérol par filtration ultra-rapide et mesure de P_{gl} 76

III.B.3. Détection immunologique d'AQP3 77

III.B.3.a Production et purification de l'anticorps anti-AQP3 77

III.B.3.b Immunotransfert ou western blot..... 79

III.B.3.c Immunofluorescence indirecte 79

III.C. RESULTATS..... 81

III.C.1. Analyse de la présence d'AQP3 par les méthodes immunologiques..... 81

III.C.1.a Immunotransfert 81

III.C.1.b Immunofluorescence indirecte..... 83

III.C.2. Mesure des perméabilités à l'eau et au glycérol 86

III.C.2.a Perméabilité à l'eau par spectrophotomètre à flux interrompu 86

III.C.2.b Cinétique d'efflux de glycérol par spectrophotomètre à flux interrompu..... 87

III.C.2.c Perméabilité au glycérol par filtration ultra-rapide..... 88

III.C.2.d Inhibition des transports d'eau et de glycérol 89

III.D. DISCUSSION-CONCLUSION..... 94

CHAPITRE IV. PROPRIETES FONCTIONNELLES D'AQP3 ET DE CHIMERES AQP2-AQP3 EXPRIMEES DANS L'OVOCYTE DE XENOPE.....98

IV.A. INTRODUCTION..... 98

IV.B. MATERIELS ET METHODES..... 103

IV.B.1. Construction et clonage d'AQP2, d'AQP3 et des chimères dans le vecteur T7TS 103

IV.B.2. Les ovocytes de xénope..... 111

IV.B.2.a Préparation des ovocytes de xénope	111
IV.B.2.b Incubation des ovocytes avec la progestérone	112
IV.B.3. Analyse de l'expression des canaux hydriques dans les ovocytes.....	112
IV.B.3.a Immunotransfert.....	112
IV.B.3.b Immunofluorescence.....	112
IV.B.4. Tests fonctionnels	113
IV.B.4.a Mesure de la perméabilité à l'eau	113
IV.B.4.b Mesure de la perméabilité au glycérol.....	115
IV.B.4.c Mesure des coefficients de réflexion pour différents solutés	116
IV.C. RESULTATS	117
IV.C.1. Etudes préliminaires sur des ovocytes exprimant AQP3	117
IV.C.2. Détermination du coefficient de réflexion pour AQP3 exprimée dans l'ovocyte de xénope pour quelques solutés	121
IV.C.3. Etude des chimères dans les ovocytes de xénope	122
IV.C.3.a Détection de l'expression des chimères.....	122
IV.C.3.b Mesure des perméabilités à l'eau et au glycérol des chimères.....	126
IV.C.4. Coexpression des chimères AQP2-NPA' AQP3 et AQP3-NPA' AQP2.....	130
IV.C.5. Etude des P_f et P_{gly} d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation	135
IV.C.5.a Perméabilité hydrique d'ovocytes à différents stades de maturation	136
IV.C.5.b Perméabilité au glycérol d'ovocytes à différents stades de maturation	137
IV.D. DISCUSSION-CONCLUSION	140
 <u>CHAPITRE V. DETERMINATION DE L'OLIGOMERISATION D'AQP3</u>	
EXPRIMEE DANS DIFFERENTS SYSTEMES	145
<hr/>	
V.A. INTRODUCTION.....	145
V.B. MATERIELS ET METHODES	148
V.B.1. Expression d'AQP3 dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	148
V.B.1.a Construction du vecteur portant le gène codant pour AQP3.....	148
V.B.1.b Transformation de la souche W303 et W303/fps1::LEU et culture des levures	149
V.B.1.c Test fonctionnel.....	149
V.B.1.d Préparation des membranes de levure	150
V.B.2. Mesure des coefficients de sédimentation	152
V.B.2.a Préparations membranaires	152
V.B.2.b Solubilisation des protéines par divers détergents	153
V.B.2.c Séparation des protéines solubilisées sur gradient de saccharose	153
V.B.2.d Analyse des fractions par immunoblot.....	153
V.B.3. Déglycosylation des protéines	154
V.B.4. Microscopie électronique sur cryofractures de membranes d'ovocytes	154

<i>V.B.4.a Préparation des répliques</i>	154
<i>V.B.4.b Calcul de la densité de particules</i>	155
<i>V.B.4.c Calcul du diamètre des particules</i>	155
V.C. RESULTATS	156
V.C.1. Expression d'AQP3 dans la levure	156
<i>V.C.1.a Détection de l'expression d'AQP3 dans la levure</i>	156
<i>V.C.1.b Cinétique de transport de glycérol</i>	157
V.C.2. Déglycosylation d'AQP3 exprimée dans les différentes membranes	159
V.C.3. Détermination des coefficients de sédimentation	161
<i>V.C.3.a Courbe d'étalonnage</i>	161
<i>V.C.3.b Solubilisation des membranes en SDS</i>	162
<i>V.C.3.c Solubilisation des membranes en Triton X-100</i>	166
<i>V.C.3.d Solubilisation des membranes en OG</i>	168
<i>V.C.3.e Solubilisation des membranes en NLS</i>	170
V.C.4. Observation des particules intramembranaires des membranes d'ovocytes de xénope exprimant AQP3	176
<i>V.C.4.a Calcul de la densité de particules</i>	176
<i>V.C.4.b Calcul du diamètre des particules</i>	177
V.D. DISCUSSION-CONCLUSION	179
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	184
BIBLIOGRAPHIE	186
ANNEXE I. DISTRIBUTION TISSULAIRE DES PROTEINES MIPS CHEZ LES MAMMIFERES	208
ANNEXE II. SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES	210
ANNEXE III. PATHOPHYSIOLOGIE DES CANAUX HYDRIQUES	212
ANNEXE IV. LE PHENOTYPE COLTON	216
ANNEXE V. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES OBTENUS SUR DES CRISTAUX D'AQP1	218
ANNEXE VI. COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA MIGRATION DES PROTEINES	220
ANNEXE VII. LISTE DE REVUES	222
ANNEXE VIII. PUBLICATIONS	226

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Tableau I.1: Caractéristiques de la présence de canaux hydriques.....</i>	<i>18</i>
<i>Tableau I.2: Historique du clonage des canaux hydriques chez les mammifères</i>	<i>20</i>
<i>Tableau I.3: Propriétés fonctionnelles des protéines MIPs chez les mammifères.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure II.1: Profil d'hydrophobicité de l'AQP1 humaine.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure II.2: Modèle topologique de l'AQP1</i>	<i>26</i>
<i>Figure II.3: Positionnement de certains résidus mutés dans l'AQP1 humaine</i>	<i>28</i>
<i>Figure II.4: Modèle du sablier</i>	<i>30</i>
<i>Figure II.5: Schéma de purification d'AQP1.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure II.6: Observation en microscopie électronique de membranes contenant AQP1</i>	<i>33</i>
<i>Figure II.7: Cartes de projection bidimensionnelles d'AQP1 à faible résolution.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure II.8: Cartes de projection bidimensionnelles d'AQP1 à haute résolution.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure II.9: Cartes de projection tridimensionnelles d'AQP1.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure II.10: Schéma de la forme supposée des pores de quelques canaux hydriques.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure II.11: Explication possible des valeurs de σ obtenues par Meinild et al. (1998) pour AQP3 et AQP4</i>	<i>42</i>
<i>Figure II.12: Alignement des canaux hydriques de rat</i>	<i>48</i>
<i>Figure II.13: Arbre phylogénétique des canaux hydriques de rat.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure II.14: Arbre phylogénétique des aquaglycéroporines et des AQP8.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure II.15: Alignement de séquences des aquaglycéroporines et des AQP8.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure II.16: Modèle proposé pour AQP2 par Bai et al., 1996</i>	<i>56</i>
<i>Figure II.17: Position des 5 résidus conservés parmi les membres d'un sous-groupe et différents d'un sous-groupe à l'autre.....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau II.1: Analyse en cryofracture de particules intramembranaires</i>	<i>63</i>
<i>Figure III.1: Schéma du spectrophotomètre à flux interrompu.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure III.2: Utilisation du spectrophotomètre en diffusion de la lumière</i>	<i>73</i>
<i>Figure III.3: Immunotransfert utilisant l'anticorps anti-AQP3.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure III.4: Immunotransfert utilisant l'anticorps anti-AQP1</i>	<i>83</i>
<i>Figure III.5: Immunofluorescence indirecte réalisée sur les globules rouges humains et le rein de rat</i>	<i>85</i>
<i>Figure III.6: Cinétiques typiques d'efflux d'eau obtenues après un choc hyperosmotique de 100mM de saccharose.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure III.7: Cinétiques typiques d'efflux de glycérol obtenues après un choc hyperosmotique de 100 mM de glycérol.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure III.8: Efflux de glycérol à travers des fantômes d'hématies obtenus par filtration ultra-rapide</i>	<i>88</i>
<i>Figure III.9: Inhibition du transport de glycérol à travers les érythrocytes normaux et Colton</i>	<i>90</i>

Figure III.10: Inhibition du transport d'eau des érythrocytes normaux.....	92
Figure III.11: Inhibition du transport d'eau des érythrocytes Colton.....	93
Figure IV.1: Profils d'hydrophobicité de certains canaux hydriques de rat.....	99
Figure IV.2: Arbre phylogénétique des boucles B et E des canaux hydriques de rat	100
Figure IV.3: Arbre phylogénétique de la boucle C et du 2ème passage transmembranaire des canaux hydriques de rat	101
Figure IV.4: Schéma des 4 chimères	102
Figure IV.5: Carte de l'AQP3 de rat dans le vecteur pSport	103
Figure IV.6: Partie du plasmide T7TS utilisé pour la transcription.	104
Figure IV.7: Séquences des chimères à l'extrémité C-terminale.....	105
Figure IV.8: Carte du vecteur pBlueScript contenant AQP2 ou AQP2-AQP3 Cter	106
Figure IV.9: Carte du vecteur Psport 2 délété contenant AQP3-NPA'AQP2 et AQP3-AQP2 Cter.....	106
Figure IV.10: Carte du vecteur pBlueScript contenant AQP2-NPA' AQP3.....	107
Figure IV.11: Schéma d'enregistrement du gonflement des ovocytes	114
Figure IV.12: Effet du temps d'attente entre l'injection et le transport de glycérol.	117
Figure IV.13: Effet de la quantité d'ARNc AQP3 sur le transport de glycérol	118
Figure IV.14: Effet de la concentration en glycérol sur la perméabilité des ovocytes.....	119
Figure IV.15: Cinétique d'entrée de glycérol.....	120
Figure IV.16: Mesure des coefficients de réflexion pour quelques solutés.....	121
Figure IV.17: Analyse de la présence des chimères dans les membranes d'ovocytes de xénope.....	122
Figure IV.18: Immunofluorescence sur un ovocyte AQP2-AQP3 Cter.....	124
Figure IV.19: Immunofluorescence sur un ovocyte AQP2-NPA' AQP3	124
Figure IV.20: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP2-AQP3 Cter	126
Figure IV.21: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP2 NPA' AQP3	127
Figure IV.22: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP3-AQP2 Cter	128
Figure IV.23: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP3 NPA' AQP2	129
Figure IV.24: Perméabilité au glycérol des ovocytes coinjectés.....	131
Figure IV.26: P_f d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation et effet de la progestérone.....	136
Figure IV.27: P_{gly} d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation et effet de la progestérone	138
Figure IV.28: Modèle hypothétique d'AQP3	141
Figure V.1: Schéma des vecteurs pYX222 et pYX223	148
Figure V.2: Détection d'AQP3 dans les levures.....	156
Figure V.3: Entrée de ^{14}C -glycérol 1mM dans les levures en fonction du temps	157
Figure V.4: Entrée de ^{14}C -glycérol 100 mM dans les levures en fonction du temps.	158
Figure V.5: Déglycosylation d'AQP3 exprimée dans différentes membranes.....	160
Figure V.6: Courbe d'étalonnage des coefficients de sédimentation	161
Figure V.7: Membranes de globules rouges solubilisées dans 1% SDS	163
Figure V.8: Membranes d'ovocytes AQP3 solubilisées dans 1% SDS.....	164

<i>Figure V.9: Membranes de levures solubilisées dans 1% SDS</i>	<i>165</i>
<i>Figure V.10: Membranes de globules rouges solubilisées dans 1% Triton X-100.....</i>	<i>167</i>
<i>Figure V.11: Membranes d'ovocytes exprimant AQP3 solubilisées dans 1% Triton X-100</i>	<i>168</i>
<i>Figure V.12: Membranes de globules rouges solubilisées dans 2% d'OG.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure V.13: Membranes de globules rouges solubilisées dans 2% NLS</i>	<i>171</i>
<i>Figure V.14: Membranes de globules rouges solubilisées dans 2% NLS à pH 6,2</i>	<i>172</i>
<i>Figure V.15: Autres membranes solubilisées dans 2% NLS.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure V.16: Membranes d'ovocytes exprimant AQP3-AQP2 Cter solubilisées dans 2% NLS.....</i>	<i>174</i>
<i>Figure V.17: Photos de cryofractures de membranes d'ovocytes.....</i>	<i>176</i>
<i>Tableau V.1: Densités des particules observées sur la surface des ovocytes.....</i>	<i>177</i>
<i>Figure V.18: Mesure des tailles des particules en relation avec leur fréquence.....</i>	<i>178</i>

ABREVIATIONS

β -ME:	β -mercaptoéthanol
2D, 3D	Bidimensionnel, Tridimensionnel
Aa:	Acides aminés
ADNase:	Désoxyribonucléase
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AE1;	Anion exchanger 1 (bande 3 du globule rouge)
AFM:	Atomic force microscopy (microscopie à force atomique)
AMPc:	Adénosine Monophosphate cyclique
AQP:	Aquaporine
ARNase:	Ribonucléase
ARNc, ARNm:	Acide ribonucléique complémentaire, Acide ribonucléique messenger
BSA:	Bovine serum albumin (albumine sérique de boeuf)
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (canal chlore)
CHIP28:	Channel forming Integral Membrane Protein of 28 kDa
CHO:	Lignée cellulaire issue de cellules d'ovaire de Hamster chinois
CIAA:	Chloro-isoamyl alcohol
CMC:	Concentration micellaire critique
Cpm:	Coups par minute
DIDS:	4, 4'-Diisothiocyno stilbène 2, 2'-disulfonic
DM:	Dodécyl maltoside
DO:	Densité Optique
DTT:	Dithiothréitol
Ea:	Energie d'activation
EDTA:	Acide éthylène-diamine tétra-acétique
FITC:	Fluoresceine isothiocyanate
GlpF:	Glycerol facilitator
GLUT1:	Glucose transporter 1 (bande 4,5 du globule rouge)
HEPES:	N-2-hydroxyléthylpiperazine-N-2-éthanesulfonic acid
IMP:	Intramembranous particles (particules intramembranaires)
Kb:	kilo base
kDa:	kilo Dalton
LLC-PK1:	Lignée cellulaire issue de cellules épithéliales de rein de porc
MIP:	Major Intrinsic Protein
NDI:	Nephrogenic diabetes insipidus (Diabète nephrogénique insipide)
NLS:	N-Lauroyl sarcosine
OAPs:	Orthogonal arrays of particles (réseau orthogonal de particules)
OG:	n-octyl- β -D-glucopyranoside
ORF:	Open reading frame (cadre ouvert de lecture)
PAF:	Paraformaldéhyde
PAGE:	Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide
Pb:	Paire de bases
PBS:	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)
pCMBS:	Parachloromercuribenzène sulfonate
PCR:	Polymerase Chain Reaction (réactions de polymérisation en chaîne)
P_d :	Coefficient de perméabilité hydrique diffusionnel
P_t , (p_t):	Coefficient de perméabilité hydrique osmotique global (unitaire)
P_{gly} :	Coefficient de perméabilité au glycérol
PKA:	Protéine kinase A
PMSF:	Phényl méthyl sulfonyl fluoride
RE:	Réticulum endoplasmique
Rh:	Rhésus
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
TCA:	Trichloroacetic acid
Tris:	Tris (hydroxyméthyl amino méthane)
Triton X-100:	Terbutyl octyl phénol poly(éthylène glyco-éther) _n

PREFACE

La découverte des protéines responsables des mouvements d'eau, les aquaporines ou canaux hydriques, a permis une grande avancée dans la compréhension des phénomènes de régulation osmotique. Ces protéines sont capables de rétablir rapidement un équilibre hydrique à travers les membranes cellulaires. Alors que les aquaporines, AQP1, AQP2..., sont très sélectives pour l'eau, les aquaglycéroporines au contraire, telle AQP3 se montrent également perméables à de petits solutés neutres comme le glycérol et l'urée.

Après une introduction générale relatant les connaissances actuelles sur les aquaporines, nous décrirons les travaux effectués dans l'intention de mieux comprendre les relations structure-fonction de ces protéines membranaires.

L'objectif de cette étude est de déterminer les éléments structuraux impliqués dans la sélectivité des canaux hydriques et notamment de savoir, à travers l'étude fonctionnelle et structurale d'AQP3, si cette différence est liée à la structure du monomère ou à son organisation quaternaire dans la membrane.

Dans un premier travail, nous avons porté notre attention sur un tissu présentant des perméabilités à l'eau et au glycérol très élevées: le globule rouge humain. La perméabilité hydrique élevée de cette cellule est due essentiellement à AQP1. Nous avons démontré que la perméabilité au glycérol du globule rouge humain est due à la présence d'AQP3.

Nous avons ensuite étudié la fonction de différentes chimères construites à partir d'une aquaporine et d'une aquaglycéroporine après expression dans l'ovocyte de xénope. Ceci nous a permis de cerner quelques éléments structuraux pouvant être responsables des différences de propriétés fonctionnelles observées.

La structure d'AQP1 a été déterminée par cristallographie en 3D à environ 6 Å de résolution. Elle se présente sous forme tétramérique. Il nous a paru intéressant de connaître l'organisation structurale d'AQP3, de sélectivité différente. Nous nous sommes donc engagés dans la détermination de la forme oligomérique d'AQP3 dans les membranes de différents systèmes; un système natif: le globule rouge humain, et deux systèmes hétérologues, l'ovocyte de xénope et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

PARTIE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE

Le fonctionnement d'une cellule nécessite des échanges de matière et d'information avec l'environnement extérieur. Chaque cellule est entourée d'une membrane plus ou moins perméable aux différentes molécules, la membrane plasmique, qui fait office de barrière vis à vis du milieu extracellulaire. La membrane plasmique permet la compartimentation et le maintien des milieux de composition différente de part et d'autre de celle-ci. Cette compartimentation existe également entre le cytosol et le lumen des organites (mitochondries, noyau, chloroplastes, lysosomes...). La communication avec le milieu extérieur s'effectue grâce à certaines protéines membranaires qui y sont fixées, les récepteurs, par exemple, qui participent au transfert d'information. Les membranes sont également le siège de la transformation d'énergie auxquelles participent de nombreuses protéines comme les ATPases ou les cytochromes. D'autres protéines membranaires assurent le transport de matière: les canaux et les transporteurs, comme les canaux hydriques qui permettent un mouvement rapide d'eau d'un compartiment cellulaire à l'autre en cas de brusques variations d'osmolarité.

L'eau est le constituant principal des êtres vivants. Elle représente 80% de la masse corporelle chez l'homme. Elle est en perpétuel mouvement et se déplace à l'intérieur des tissus, d'une cellule à l'autre au travers des membranes. L'existence de canaux hydriques était envisagée depuis très longtemps puisque les perméabilités hydriques élevées observées à travers les membranes de certaines cellules, ne pouvaient s'expliquer par la seule diffusion passive au travers d'une bicouche lipidique. La découverte des canaux hydriques a permis d'augmenter nos connaissances dans le domaine de la physiologie et plus particulièrement dans la régulation de l'osmolarité. Ces protéines appartiennent à la

vaste famille des protéines MIP (*Major Intrinsic Protein*) qui compte actuellement 200 représentants environ. On y distingue trois sous-groupes classés suivant leur sélectivité: les aquaporines, strictement perméables à l'eau, les aquaglycéroporines, perméables à l'eau et aux solutés, et les transporteurs de glycérol. Chez certains organismes, les protéines de la famille MIP sont nombreuses et peuvent être colocalisées dans la même cellule où elles présentent des variations au niveau de leur sélectivité, leur fonction, leur localisation et leur régulation.

I.A. DECOUVERTE DU PREMIER CANAL HYDRIQUE

On a longtemps pensé que l'eau passait à travers les membranes par simple diffusion à travers la bicouche lipidique. Cependant, les valeurs de perméabilité hydrique observées dans certaines membranes, et en particulier dans le globule rouge, suggéraient la présence de pores spécifiques pour cette fonction. En effet, plusieurs équipes avaient montré que la perméabilité hydrique y était très élevée et qu'elle était inhibée par le para-chloromercuribenzène sulfonate (pCMBS) (Macey et Farmer, 1970; Solomon, 1968). Dès lors, il était proposé que l'échangeur anionique (Solomon *et al.*, 1983), ou le transporteur de glucose indépendant du sodium (Fischbarg *et al.*, 1989; Fischbarg *et al.*, 1990), pouvaient constituer des voies de passage protéiques empruntées par l'eau mais ils ne pouvaient cependant participer aux perméabilités très élevées observées dans certaines membranes. L'existence de protéines spécifiques pour le transport d'eau était alors devenue évidente.

C'est en essayant de purifier une sous-unité de l'antigène Rhésus à partir de globules rouges humains que Peter Agre et Barbara Smith firent cette découverte tant attendue. Leurs échantillons étaient sans cesse contaminés par une molécule de taille inférieure (Agre *et al.*, 1987; Saboori *et al.*, 1988). Ils pensaient tout d'abord à un produit de dégradation de l'antigène Rh mais ce contaminant s'avérait être bel et bien une autre

molécule faisant partie de la membrane du globule rouge. Elle existait sous deux formes: une forme observée à 28 kDa et une forme glycosylée s'étalant entre 35 et 60 kDa. Cette protéine était largement exprimée, surtout dans le rein. Lorsque la partie NH₂-terminale a été analysée et comparée avec celle des séquences connues de protéines, une forte homologie avec MIP26 de cristallin bovin (Gorin *et al.*, 1984) a été observée (Smith et Agre, 1991).

En l'espace d'un an, l'ADNc de cette mystérieuse molécule fut cloné à partir d'une banque d'érythroïdes de foie fœtal humain (Preston et Agre, 1991). Son ARNm fut injecté dans les ovocytes de xénope. Les auteurs observèrent qu'après immersion des ovocytes dans l'eau, ils gonflèrent rapidement jusqu'à éclater. L'équipe avait trouvé le premier canal hydrique, nommé CHIP28 (**CH**annel forming **I**ntegral **P**rotein of **28** kDa). Leurs travaux furent publiés dans Science en 1992 (Preston *et al.*, 1992). L'étude de la perméabilité de ce canal purifié à partir de globules rouges humains et reconstitué dans des liposomes a montré que CHIP 28 est bien le canal hydrique, qu'aucune autre protéine n'est nécessaire à sa fonction et que le transport d'eau n'est pas non plus dû à la présence d'un canal hydrique endogène de l'ovocyte (Van Hoek et Verkman, 1992; Zeidel *et al.*, 1992).

Les paramètres caractérisant la présence de canaux hydriques dans les membranes sont représentés dans le tableau ci-dessous. Une faible valeur de perméabilité ne veut cependant pas forcément dire une absence d'aquaporines car elles peuvent être présentes en très faible quantité puisque la valeur de perméabilité est fonction du nombre de canaux présents à la membrane. De plus, certains canaux hydriques sont insensibles aux agents mercuriels.

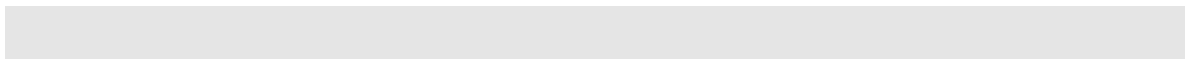


Tableau I.1: Caractéristiques de la présence de canaux hydriques

	<i>Voie lipidique</i>	<i>Voie protéique</i>
P_f (cm/s)	$< 5 \times 10^{-3}$	$> 10^{-2}$
P_f/P_d	=1	>1
E_a (kcal/mol)	> 10	< 6
Inhibition par les agents mercuriels	-	+ ou -

Le coefficient de perméabilité hydrique, P_f , reflète le flux net d'eau traversant la membrane, consécutif à une différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane. Le coefficient de perméabilité diffusionnel, P_d , représente le flux net d'eau en conditions iso-osmotiques. Si l'eau passe par diffusion simple à travers la bicouche lipidique, P_f/P_d est égal à 1. Ce rapport est cependant difficile à mesurer du fait de la présence des couches non mélangées avoisinant la bicouche lipidique. Dans le cas d'un rapport égal à 1, la perméabilité hydrique est fortement dépendante de la température de par la fluidité de la membrane comme on peut le montrer par le calcul de l'énergie d'activation E_a avec l'équation d'Arrhénius, $\ln P_f = -(E_a / RT) + C$ où C est une constante d'intégration reliée à l'entropie. La réalisation des expériences à basse température permet donc de minimiser le transport d'eau dû à la diffusion à travers la bicouche lipidique.

I.B. LA FAMILLE DES PROTEINES MIPS

Une des caractéristiques communes à toutes les protéines de la famille MIP est la présence d'un motif de trois acides aminés, asparagine-proline-alanine, répété deux fois dans la séquence. Ce motif consensus a permis de cloner beaucoup d'autres protéines homologues à AQP1, premier canal hydrique cloné, à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. Des membres de la même famille que l'aquaporine-1 ont dès lors été découverts non seulement chez l'homme, mais aussi chez d'autres mammifères et dans de nombreux organismes: amphibiens, insectes, bactéries, levure et plantes. Plus d'une centaine de protéines de cette famille ont été partiellement ou totalement séquencées.

I.B.1. Les protéines MIPS de mammifères

Depuis 1984, dix canaux hydriques ont été clonés chez les mammifères (homme, rat, souris). L'émergence de ces aquaporines pose la question de leur redondance et suggère que chacune pourrait jouer un rôle particulier puisque ces protéines diffèrent par leur localisation, leur sélectivité et leur régulation. C'est au niveau des néphrons, unités fonctionnelles du rein, que les canaux hydriques sont majoritairement représentés; où ils permettent une réabsorption d'eau d'environ 150 litres par jour chez l'homme.

Tableau I.2: Historique du clonage des canaux hydriques chez les mammifères

1984 AQP0 bovin ou MIP (1)	1996 AQP4 de souris (21) AQP5 humaine (22) AQP6 humaine (AQP2L ou hKID) (23)
1988 AQP0 de rat (2)	
1991 AQP1 humaine (3) AQP0 humaine (4)	1997 AQP7 de rat (24) AQP8 de rat (25, 26) AQP8 de souris (27) AQP9 humaine (AQP7L, tissu adipeux) (28)
1992 AQP1 de rat (5) AQP1 de souris (6)	
1993 AQP2 de rat (7, 8)	1998 AQP3 de souris, Ma et al. (non publié) AQP7 humaine (29) AQP7 de souris (29) AQP8 humaine (30) AQP9 humaine (leucocytes) (31) AQP9 de rat (<i>Rattus norvegicus</i> , foie) (32)
1994 AQP2 humaine (9-12) AQP2 de souris (13) AQP3 de rat (14, 15) AQP4 de rat (16, 17)	
1995 AQP3 humaine (18) AQP4 humaine (19) AQP5 de rat (20)	1999 AQP2 de souris (33) AQP9 de rat (<i>Rattus rattus</i> , foie) (34) AQP6 de rat (35)

1:(Gorin et al., 1984),
2:(Shiels et al., 1988),
3:(Preston et Agre, 1991),
4:(Pisano et Chepelinsky, 1991),
5:(Deen et al., 1992),
6:(Lanahan et al., 1992),
7:(Fushimi et al., 1993),
8:(Ma et al., 1993a),
9:(Deen et al., 1994),
10:(Uchida et al., 1994),
11:(van Lieburg et al., 1994),
12:(Sasaki et al., 1994),

13:(Uchida et al., 1994),
14:(Ishibashi et al., 1994),
15:(Echevarria et al., 1994),
16:(Jung et al., 1994a),
17:(Hasegawa et al., 1994),
18:(Ishibashi et al., 1995),
19:(Yang et al., 1995),
20:(Raina et al., 1995),
21:(Ma et al., 1996c),
22:(Lee et al., 1996),
23:(Ma et al., 1996a),
24:(Ishibashi et al., 1997a),

25:(Ishibashi et al., 1997b),
26:(Koyama et al., 1997),
27:(Ma et al., 1997),
28:(Kuriyama et al., 1997),
29:(Ishibashi et al., 1998b),
30:(Koyama et al., 1998),
31:(Ishibashi et al., 1998a),
32:(Tsukaguchi et al., 1998),
33:(Yang et al., 1999b),
34:(Ko et al., 1999),
35:(Yasui et al., 1999b)

La comparaison des séquences et des propriétés fonctionnelles de ces protéines a permis de les classer en deux catégories:

- les aquaporines, sélectivement perméables à l'eau,
- les aquaglycéroporines, perméables à l'eau et à certains petits solutés.

Au moins six membres clonés font partie de la famille des aquaporines: **AQP0**, initialement nommée MIP26 car son rôle n'avait pas été bien déterminé; son expression est limitée aux cellules fibreuses du cristallin; **AQP1**, est exprimée de façon très ubiquitaire; **AQP2** est présente uniquement dans le rein, au niveau de la membrane apicale des cellules principales du canal collecteur, elle est régulée par la vasopressine; **AQP4**, aquaporine majeure du cerveau, est aussi localisée dans la membrane basolatérale du canal collecteur de rein; **AQP5**, est exprimée dans les glandes salivaires; **AQP6** est trouvée dans les cellules intercalaires du canal collecteur de rein.

La première aquaglycéroporine clonée est **AQP3** (Echevarria *et al.*, 1994; Ishibashi *et al.*, 1994), et sa séquence est proche de celle du transporteur de glycérol de bactérie, GlpF, dont on parlera plus loin. Cette protéine est très ubiquitaire mais on la trouve abondamment dans la membrane basolatérale des cellules principales du canal collecteur (Ecelbarger *et al.*, 1995). D'autres aquaglycéroporines ont été clonées dans des tissus où l'on soupçonnait leur existence. La première, **AQP7**, a été isolée du testicule de rat (Ishibashi *et al.*, 1997a). Une autre protéine désignée **AQP9** a été clonée dans le foie où elle est hautement exprimée (Ishibashi *et al.*, 1998a; Tsukaguchi *et al.*, 1998).

Les **AQP8** de rat (Ishibashi *et al.*, 1997b; Koyama *et al.*, 1997) et de souris (Ma *et al.*, 1997) ne présentent pas de grande identité de séquence ni avec les aquaporines, ni avec les aquaglycéroporines. Elle pourrait être la première protéine MIP clonée faisant partie d'une nouvelle sous-famille (Heymann et Engel, 1999).

Une distribution tissulaire détaillée est donnée en annexe I.

Le tableau suivant montre la sélectivité, le nombre d'acides aminés et la sensibilité du transport d'eau vis à vis des agents mercuriels, de certains canaux hydriques de rat, de souris et humains.

Tableau I.3: Propriétés fonctionnelles des protéines MIPs chez les mammifères

Sous-famille	Sélectivité			Nom	Nb aa	Inhibition P _f mercuriels
Aquaporines				<i>h,rAQP1</i>	269	<i>Oui</i>
				<i>h,r,sAQP2</i>	271	<i>Oui</i>
				<i>h,rAQP4</i>	301, 323	<i>Non</i>
				<i>h,rAQP5</i>	265	<i>Oui</i>
				<i>hAQP6</i>	282	<i>Oui</i>
				<i>hAQP8 (30)</i>	261	<i>?</i>
				<i>rAQP8 (25, 26)</i>	263	<i>Oui</i>
Aquaglycéro- porines	E A U	U R G L Y C E R O L		<i>sAQP8 (27)</i>	261	<i>Oui</i>
				<i>hAQP9 (31)</i>	295	<i>Oui</i>
				<i>h,rAQP3</i>	292	<i>Oui</i>
				<i>rAQP7 (24)</i>	269	<i>Non</i>
				<i>rAQP9 (32, 34)</i>	295	<i>Oui</i>
				<i>hAQP9 (28)</i>	342	<i>Oui</i>
				<i>Non connu</i>	-	-

Les numéros entre parenthèses correspondent aux numéros des références citées dans le tableau I.2. (h= humain, r= rat, s= souris).

I.B.2. Les protéines MIPs d'autres espèces

Les mouvements d'eau à travers les cellules et les tissus étant un processus fondamental, il n'est pas surprenant que les canaux hydriques soient également présents chez les vertébrés et les invertébrés, mais aussi chez les organismes inférieurs que sont les microorganismes, et chez les plantes.

Des protéines MIP ont été clonées chez les batraciens: dans la vessie de crapaud *Bufo marinus* (Ma *et al.*, 1996b) et dans la peau de grenouille *Rana esculenta* où elle est nommée **FA-CHIP** (Frog Aquaporin-**CHIP**) (Abrami *et al.*, 1994). Chez *Cicadella viridis*, insecte suceur de sève, **AQPcic** est présente dans la chambre filtrante (Le Caherec *et al.*, 1996). **BIB** (**BIg Brain**), la plus longue protéine de la famille (700 aa) est trouvée dans le cerveau de drosophile (Rao *et al.*, 1990) mais sa fonction n'a pas été déterminée. **AQP-CE1** est présente dans le nématode *Caenorhabditis elegans* (Kuwahara *et al.*, 1998).

De nombreux membres de la famille MIP ont été identifiés chez les plantes. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, au moins 23 aquaporines sont présentes (Weig *et al.*, 1997). Elles sont réparties en deux groupes selon leur localisation dans les cellules; les **PIPs** (**P**lasma **M**embrane **I**ntrinsic **P**rotein) contenues dans la membrane plasmique, assurent les mouvements d'eau entre la cellule et son environnement, et les **TIPs** (**T**onoplast **I**ntrinsic **P**rotein) présentes dans le tonoplaste, membrane entourant la vacuole chez les plantes, sont responsables de la régulation osmotique à l'intérieur de la cellule et de la pression de turgescence. Leur présence est régulée suivant le stade de développement de la plante et elles interviennent dans divers processus physiologiques (Maurel, 1997). **γ-TIP** a été la première protéine MIP chez les plantes, identifiée comme étant un canal hydrique (Maurel *et al.*, 1993). Elle est exprimée préférentiellement dans les cellules de racine en elongation et dans les tiges. La réhydratation au cours de la germination de la graine fait intervenir **α-TIP** (Johnson *et al.*, 1990). **δ-TIP** a été clonée en 1996 (Daniels *et al.*, 1996). **Nt-TIPa** a été clonée à partir de cellules de tabac, elle est perméable à l'eau, au

glycérol et à l'urée (Gerbeau *et al.*, 1999). **Nod26** est une protéine présente au niveau de la racine de soja qui intervient dans le bourgeonnement (Rivers *et al.*, 1997). **NtAQP1** a été trouvée récemment dans la membrane plasmique de *Nicotiana tabacum* (Biela *et al.*, 1999). Des canaux hydriques ont aussi été clonés dans la betterave *Beta vulgaris* (Barone *et al.*, 1997). Pour plus d'informations sur les protéines MIP de plantes, se référer aux revues récentes (Chrispeels *et al.*, 1999; Maurel, 1997; Schaffner, 1998; Weig *et al.*, 1997).

Le séquençage total des gènes de nombreux microorganismes a révélé la présence de gènes appartenant à la famille des protéines MIPs. Dans la bactérie *Escherischia coli*, seulement deux protéines y sont représentées: **AQPZ**, essentiellement perméable à l'eau, qui intervient dans la croissance (Calamita *et al.*, 1995) et **GlpF**, qui ne transporte que du glycérol (Maurel *et al.*, 1994) et qui fait partie d'une sous-famille distincte des aquaporines et des aquaglycéroporines, les facilitateurs de glycérol. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux gènes sont apparentés aux aquaporines perméables uniquement à l'eau (AQY1 et AQY2) et deux gènes, aux aquaporines perméables aux solutés, dont Fps1 (André, 1995); (Goffeau *et al.*, 1996). Seule une souche de levure parmi celles testées donne une protéine fonctionnelle à partir du gène **AQY1** (Bonhivers *et al.*, 1998; Laizé *et al.*, 1999). **Fps1**, code pour un transporteur de glycérol (Luyten *et al.*, 1994; Luyten *et al.*, 1995).

CHAPITRE II. STRUCTURE/FONCTION DES PROTEINES MIPS

II.A. AQP1: MODELE DE BASE POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES PROTEINES MIPS

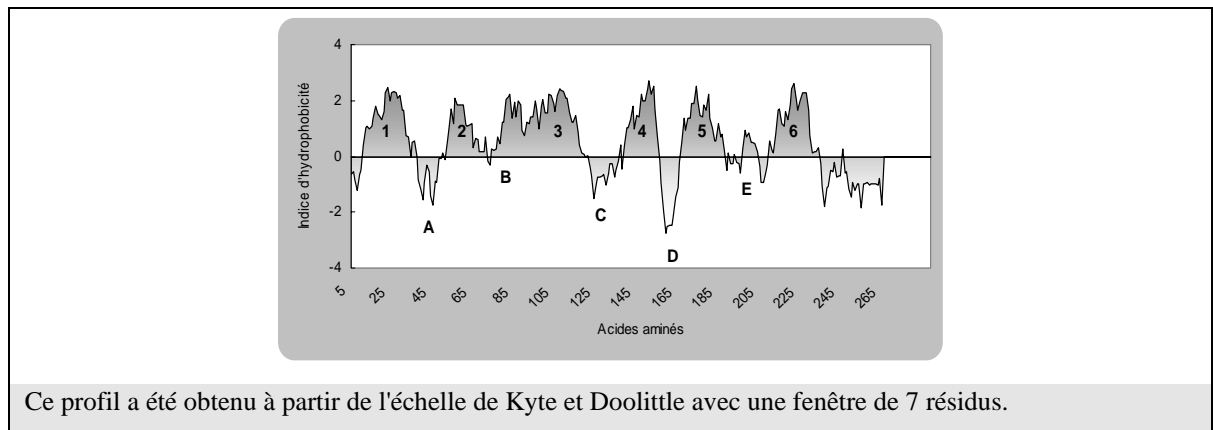
AQP1 a été l'aquaporine la plus étudiée pour plusieurs raisons. Elle est le premier canal hydrique découvert et elle est la seule à se trouver en abondance dans un tissu, le globule rouge, d'où elle est aisément purifiable.

II.A.1. Détermination de la structure tertiaire

II.A.1.a Profil d'hydropathie

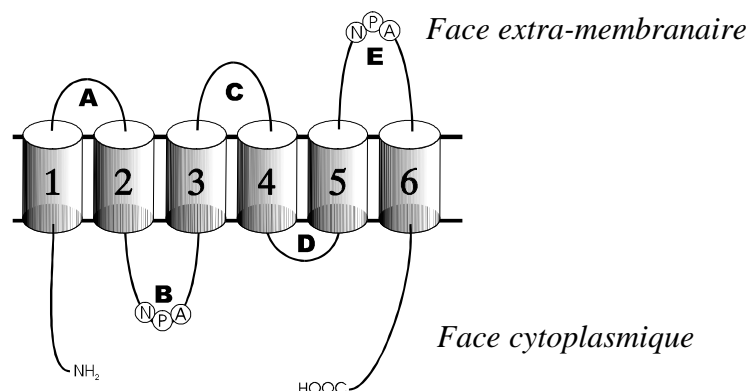
L'ADN complémentaire codant pour l'AQP1 humaine possède une phase ouverte de lecture de 807 paires de bases et la taille de son ARN messager est d'environ 2,8 kb sur northern-blot. Il code pour une protéine de 269 acides aminés. L'analyse du profil d'hydropathie d'AQP1 suggère la présence de six passages transmembranaires (1-6) reliés par 5 segments polaires (boucles A-E) correspondant aux domaines extramembranaires (Preston et Agre, 1991).

Figure II.1: *Profil d'hydrophobicité de l'AQP1 humaine*



AQP1 contient un long segment polaire en C-terminal. Les deux moitiés N et C-terminales se composent de trois passages transmembranaires très proches, notamment les boucles B et E qui possèdent chacune les motifs N-P-A (Asparagine-Proline-Alanine) et dont l'hydrophilicité est plus faible que les autres boucles. Ce motif est caractéristique des membres de la famille MIPs mais l'on rencontre quelques exceptions où un résidu sur trois est différent dans une des deux boucles. Cependant, la proline est très conservée et pourrait jouer un rôle important dans la formation d'un coude. La protéine pourrait être formée par la duplication d'un gène ancestral commun constitué de trois passages transmembranaires (Pao *et al.*, 1991; Wistow *et al.*, 1991).

Figure II.2: Modèle topologique de l'AQP1



Le modèle à six passages transmembranaires a été confirmé par plusieurs travaux. L'insertion d'épitopes à différents sites montre une topologie à 6 passages

transmembranaires. Seuls les mutants fonctionnels ont été pris en compte et il faut signaler que les mutants dont les épitopes ont été insérés dans les boucles B et E présentent une fonction très réduite (après Q88 et V201 (Preston *et al.*, 1994a). Des anticorps dirigés spécifiquement contre les boucles C et E ont été utilisés pour montrer qu'elles sont extracellulaires (Stamer *et al.*, 1996).

Bien que le modèle à six passages transmembranaires ait été adopté, d'autres équipes ont démontré une topologie différente. Un laboratoire avait montré l'existence de 4 passages transmembranaires au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Shi *et al.*, 1995; Skach *et al.*, 1994) et l'on pourrait penser que la topologie obtenue ne reflète en rien celle de la protéine mature à la membrane plasmique. D'ailleurs, les travaux de Ma *et al.* ont montré que des vésicules provenant de RE ne possédaient pas une perméabilité hydrique élevée alors que les vésicules provenant de fractions golgiennes avaient une forte perméabilité hydrique (Ma *et al.*, 1993b).

Un autre modèle a été proposé dans lequel 16 feuillets β formeraient un tonneau similaire à celui des porines bactériennes. Ce modèle a été construit d'après les calculs algorithmiques de structures secondaires mais il n'a pas été testé expérimentalement. La boucle C serait intracellulaire dans ce modèle (Fischbarg *et al.*, 1995).

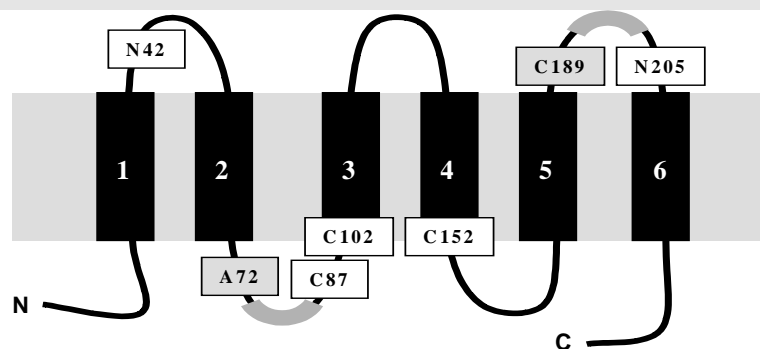
II.A.1.b Modèle du sablier

La mutagenèse dirigée est un outil fréquemment utilisé pour la compréhension de la structure des protéines. Elle a permis de déterminer le rôle de certains résidus ou leur localisation au sein de la protéine.

Parmi les deux sites possibles de glycosylation présents sur l'AQP1 humaine (N42 situé dans la boucle A et N205, dans la boucle E), seule la mutation de l'asparagine 42 (N42Q) élimine la forme glycosylée d'AQP1 (Preston *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1993a). C'est donc l'asparagine 42 qui est glycosylée, ceci indique qu'elle est située sur la face externe de la membrane. Ce même mutant possède encore sa fonction de transport hydrique lorsqu'il est exprimé à la membrane de l'ovocyte de xénope, indiquant que la glycosylation n'est pas nécessaire à l'adressage et à la fonction dans l'ovocyte (Preston *et al.*, 1994a).

Les études pharmacologiques menées sur l'aquaporine-1 ont montré que la fonction de cette protéine était inhibée par les agents mercuriels qui agissent sur les cystéines. Cette inhibition est réversée par addition de composés réducteurs des radicaux sulfhydryl comme le dithiotréitol (DTT) ou le β -mercaptoéthanol (β -ME). Les quatre cystéines existant dans l'AQP1 humaine (87, 102, 152 et 189) ont été mutées en sérine (Preston *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993b)

Figure II.3: Positionnement de certains résidus mutés dans l'AQP1 humaine



Les quatre cystéines, l'alanine de la boucle B à la position équivalente de la cystéine 189 de la boucle E et les deux asparagines susceptibles d'être glycosylées sont représentées. Les motifs NPA sont représentés par un segment gris.

Seule la protéine mutée C189S s'est révélée insensible au mercure, montrant une localisation de ce résidu probablement proche du pore hydrique. La position équivalente à

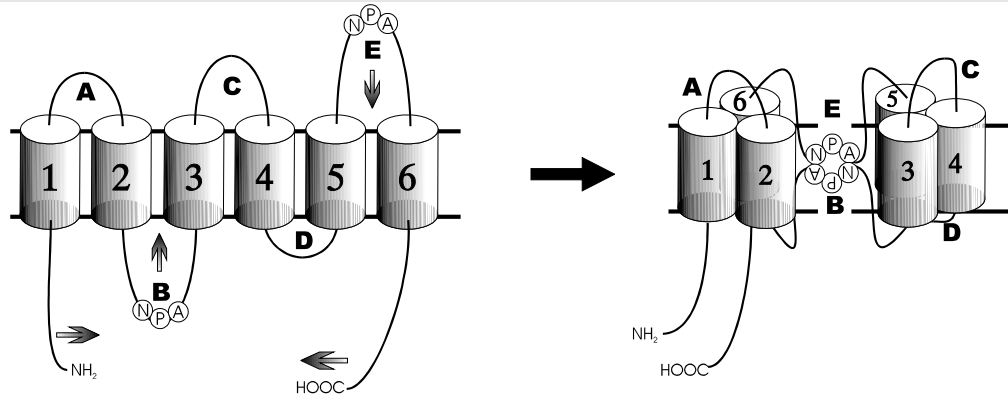
cette cystéine dans la boucle B de la protéine est une alanine en position 72. Si cette alanine est remplacée par une cystéine dans la protéine C189S, le double mutant obtenu A73C/C189S redevient sensible au mercure, suggérant que cette alanine en position 73 est également proche du pore. D'autre part, toute une série de mutants a été générée dans lesquels les résidus correspondant aux positions 187 jusqu'à 197, c'est à dire dans la boucle E sont remplacés par une cystéine. Ces mutants possèdent une perméabilité à l'eau réduite mais sont encore sensibles au mercure (Jung *et al.*, 1994b).

Pour déterminer si la cystéine 189 se trouve à la surface externe ou cytoplasmique, un composé imperméant mercurique, le pCMB-dextran, a été synthétisé et testé sur la perméabilité hydrique d'érythrocytes intacts ou de vésicules d'érythrocytes "inside-out". Les résultats ont montré que la cystéine 189 se situe sur la face externe (Zhang *et al.*, 1993b).

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de remplacer la cystéine 189 d'AQP1 par des résidus plus encombrants comme la valine, la méthionine, le tryptophane ou la tyrosine afin de vérifier l'hypothèse de l'encombrement éventuel du pore hydrique. Ces mutants exprimés dans l'ovocyte de xénope ont montré un défaut de glycosylation suggérant la présence d'une protéine non mature mal adressée à la membrane plasmique (Preston *et al.*, 1993). Cependant, la mutation C189W n'affecte pas la présence de cette protéine à la membrane plasmique (Shi *et al.*, 1994). La perméabilité hydrique d'ovocytes exprimant cette protéine mutée n'est pas plus élevée que celle d'ovocytes témoins indiquant que le résidu tryptophane inséré à la place du résidu cystéine 189 dans la boucle E générerait donc le passage d'eau à travers le pore.

C'est à la suite de ces observations que le modèle du "sablier" a été proposé (Jung *et al.*, 1994b).

Figure II.4: Modèle du sablier



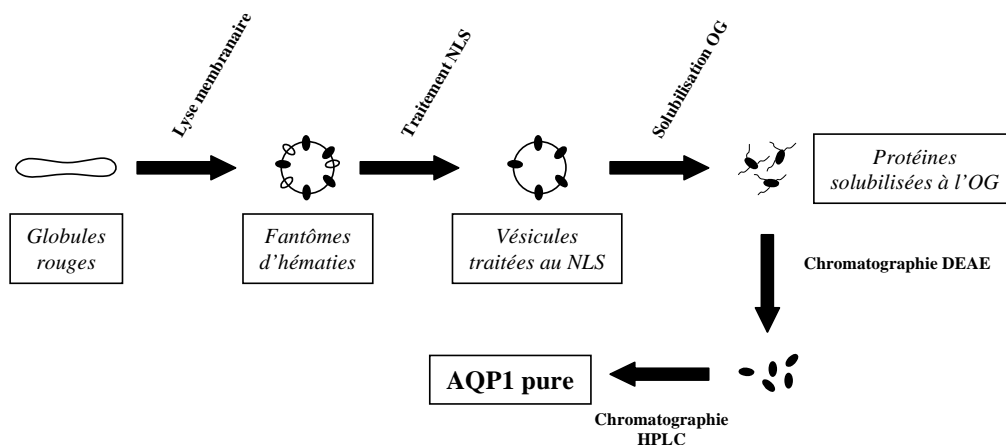
Les boucles B et E composées des motifs répétés N-P-A, interagiraient au milieu de la bicouche lipidique pour former le pore. D'après Jung et al. (1994).

L'interaction des boucles B et E pour former le pore dans la bicouche lipidique s'effectuerait par le rapprochement des segments 1, 2 et 6 d'une part, et des segments 3, 4 et 5 d'autre part.

II.A.2. Purification à partir des globules rouges humains

L'annexe II montre comment il est possible de solubiliser une protéine membranaire. La purification d'AQP1 à partir de globules rouges humains permet d'obtenir aisément 10 mg d'AQP1. AQP1 serait en effet une des rares protéines à être peu solubilisée par le détergent anionique N-lauroyl-sarcosine (NLS) (Denker *et al.*, 1988; Van Hoek et Verkman, 1992).

Figure II.5: Schéma de purification d'AQP1



Des membranes de fantômes d'hématies traitées à l'iodure de potassium (KI) ont été préparées et les protéines membranaires autres qu'AQP1 sont extraites par 2% de NLS. Pour l'obtention d'AQP1 hautement purifiée, un traitement avec de l'octyl glucoside (OG) pendant une heure, suivi d'un passage sur colonne échangeuse d'ions puis sur colonne d'exclusion par la taille permet l'élution de la protéine.

L'échantillon obtenu montre alors deux bandes sur SDS-PAGE: une à 28 kDa (AQP1 non glycosylée) et une s'étalant entre 35 et 60 kDa correspondant à la glycosylation d'AQP1. Environ 50% d'AQP1 serait glycosylée (Schulte et van Hoek, 1997; van Hoek *et al.*, 1995), contrairement aux observations de Denker *et al.* où un monomère sur 4 serait glycosylé (Denker *et al.*, 1988).

AQP1 contient 5,4 kDa de monosaccharides constitués (en nombre de molécules) de: fucose (2), galactose (8), galactosamine (1), glucosamine (13), mannose (3), acide N-acétylneuraminique (1) (van Hoek *et al.*, 1995). Il a été montré une étroite association entre la forme glycosylée et non glycosylée qui sont éluées en dimères dans un même pic après solubilisation en OG et passage sur colonne. Cette association peut être brisée après action à la PNGase F (clivant tous les types de N-glycosylations après l'asparagine) (van Hoek *et al.*, 1995). Le passage d'une forme dimérique vers une forme monomérique a également été observé après traitement à l'endo- β -galactosidase (clive spécifiquement les résidus

galactosyl) mais pas avec l'exo- β -galactosidase (Schulte et van Hoek, 1997). Ces résultats pourraient suggérer que le polylactose amine, et non les saccharides terminaux, serait impliqué dans l'interaction entre les hétéromonomères. Cependant, AQP1 purifiée et déglycosylée s'assemble en tétramères dans les protéoliposomes reconstitués et sa fonction n'est pas altérée (van Hoek *et al.*, 1995). Par contre, d'autres auteurs ont montré que les tétramères étaient toujours présents après solubilisation dans l'OG (Smith et Agre, 1991; Walz *et al.*, 1994b). Le coefficient de sédimentation calculé à partir d'AQP1 solubilisée dans le SDS est de 2 S, il est de 5,7 S dans des conditions non dénaturantes (1% Triton X-100) (Smith et Agre, 1991).

II.A.3. Structures bi- et tridimensionnelles

La microscopie électronique sur tissus congelés permet de visualiser certaines protéines membranaires sous forme de particules intramembranaires. Cette approche a donné une première information sur l'assemblage oligomérique et sur l'organisation membranaire d'AQP1. Les travaux menés sur les membranes cellulaires natives (érythrocytes, cellules CHO (cellules issues d'ovaires de hamster chinois) transfectées avec AQP1 et diverses membranes de rein) ou sur des protéoliposomes reconstitués ont révélé la présence de tétramères dans ces membranes (Verbavatz *et al.*, 1993). Le calcul du diamètre des particules observées pour AQP1 dans la membrane du globule rouge, est en accord avec un assemblage tétramérique. Des travaux semblables de cryofracture de protéoliposomes reconstitués avec AQP1 effectués après suppression de la partie C-terminale par digestion protéolytique a montré que ni l'oligomérisation, ni la fonction d'AQP1 n'étaient altérées (Zeidel *et al.*, 1994).

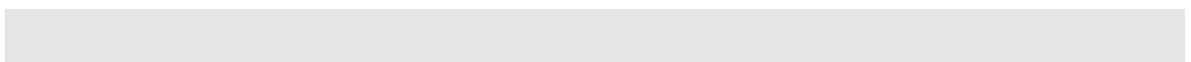
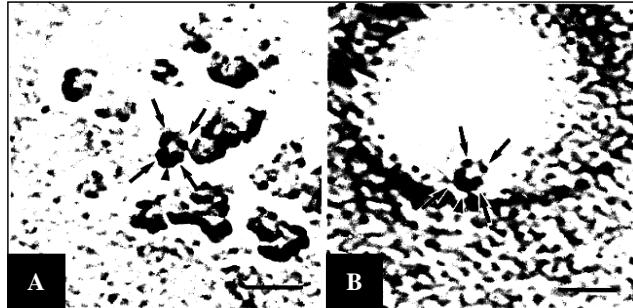


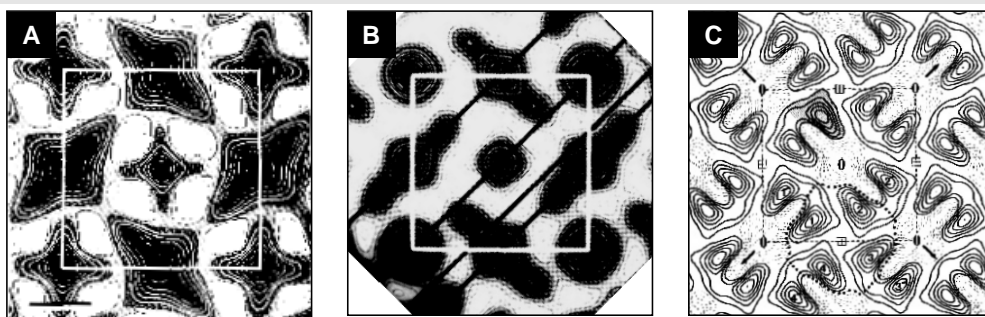
Figure II.6: Observation en microscopie électronique de membranes contenant AQP1



A, vésicules d'érythrocytes; B, protéoliposomes reconstitués avec AQP1, d'après Verbavatz et al. (1993)

Les analyses structurales d'AQP1 ont été rendues possibles par l'obtention de grandes quantités de la protéine AQP1 purifiée à partir des globules rouges humains et par la capacité de cette protéine à former des cristaux à 2 dimensions bien ordonnés après reconstitution des protéines purifiées en présence de phospholipides (Mitra *et al.*, 1994; Walz *et al.*, 1994a; Walz *et al.*, 1994b). Les cartes de projection d'échantillons en coloration négative montrent un motif cristallin comportant huit zones à forte densité avec un arrangement tétramérique autour d'un axe d'ordre 4.

Figure II.7: Cartes de projection bidimensionnelles d'AQP1 à faible résolution



Walz et al., 1994a (20 Å)

Walz et al., 1994b (16 Å)

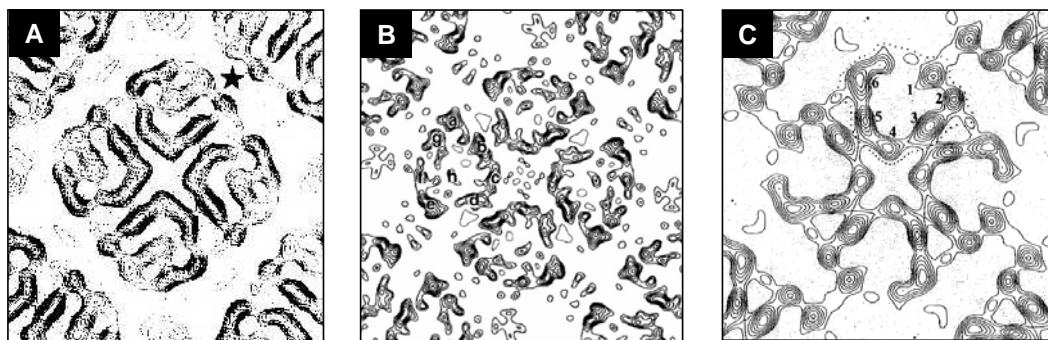
Mitra et al., 1994 (12 Å)

En A et B, un tétramère est au centre du motif cristallin (cadre blanc); en C, un tétramère est entouré en pointillé, chevauchant l'unité cellulaire encadrée. Seule la carte de projection de Mitra a été obtenue sur des cristaux à deux dimensions d'AQP1 déglycosylée.

Une reconstruction en trois dimensions à partir de différentes projections de cartes à deux dimensions a pu être obtenue. Celle-ci a révélé d'une part une orientation inversée des tétramères l'un par rapport à l'autre et d'autre part, une asymétrie du tétramère par rapport au plan de la membrane (Walz *et al.*, 1994a). La carte obtenue à 12 Å de résolution montre l'arrangement des monomères l'un par rapport à l'autre. Les dimères sont arrangés deux à deux autour d'un axe d'ordre 2. Chaque monomère est en forte interaction avec un monomère d'un tétramère voisin dont l'orientation est inversée (Mitra *et al.*, 1994).

Des cartes de projection à plus haute résolution sont représentées ci-dessous. Dans tous ces clichés, le monomère d'AQP1 apparaît sous une forme trapézoïdale mais la région centrale diffère. En glucose, la région centrale du monomère présente une densité élevée alors qu'en glace amorphe, la densité est minimum. On observe également une différence dans le nombre de pics à forte densité allant de 6-7 domaines (Mitra *et al.*, 1995) à 8 domaines (Jap et Li, 1995; Walz *et al.*, 1995). Cependant, des densités élevées peuvent aussi correspondre à des projections d'hélices α , non perpendiculaires au plan de la membrane mais penchées, ou bien à une juxtaposition de deux hélices.

Figure II.8: Cartes de projection bidimensionnelles d'AQP1 à haute résolution



Walz et al, 1995 (6 Å)

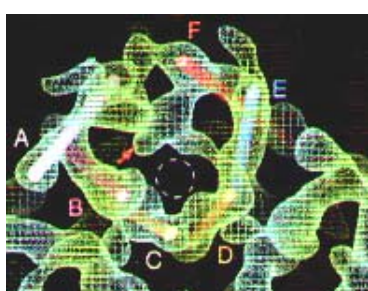
Jap et Li, 1995 (3,5 Å)

Mitra, 1995 (5,8 Å)

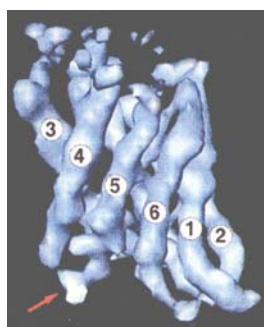
Les cartes de projection à deux dimensions ont été réalisées sur des cristaux à deux dimensions d'AQP1 inclus dans le glucose (A et B) ou inclus en glace amorphe (C).

C'est en 1997 qu'apparaissent les premiers clichés de diffraction en trois dimensions. Les résultats mettent en évidence six hélices α en torsion formant un tonneau et montrent la présence d'un axe de pseudo-ordre 2 (Cheng *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997), en accord avec le motif répété en tandem d'AQP1 (Pao *et al.*, 1991; Wistow *et al.*, 1991).

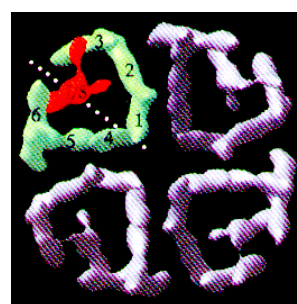
Figure II.9: Cartes de projection tridimensionnelles d'AQP1



Cheng *et al.*, 1997 (7 Å)



Walz *et al.*, 1997 (6 Å)



Li *et al.*, 1997 (6 Å)

On note un lien étroit entre les monomères des tétramères adjacents par l'intermédiaire de certaines hélices. Des pics de densité élevée au centre des monomères sont présents dans tous les clichés et ne sont pas interprétés de la même façon. Pour certains, ils sont attribués aux boucles B et E contenant les motifs NPA (Cheng *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997), et pour d'autres à deux segments transmembranaires supplémentaires (Li *et al.*, 1997). Une simulation de l'arrangement des segments transmembranaires les uns par rapport aux autres à l'aide de divers logiciels a permis la construction de différents modèles mais ces modèles doivent être redéfinis en présence d'une bicouche lipidique (Sansom *et al.*, 1998).

La localisation exacte du pore hydrique dans la protéine reste inconnue. Une structure à plus haute résolution sera nécessaire pour mieux définir le pore et comprendre la spécificité des canaux hydriques.

II.B. LES MEMBRES DE LA FAMILLE MIP

II.B.1. Systèmes d'expression hétérologue

La fonction et/ou la structure des protéines MIPs se détermine à partir de leur expression dans différents systèmes. Si la protéine est abondamment présente dans les membranes (c'est le cas d'AQP1 dans les hématies), elle peut être directement purifiée à partir de ce tissu en vue d'études structurales ultérieures ou pour être reconstituée dans des protéoliposomes. Cependant, dans la plupart des cas, la protéine est surexprimée dans des systèmes d'expression hétérologue tels que l'ovocyte de xénope, les cellules en culture, les levures ou les bactéries. De tels systèmes permettent aussi l'expression de formes mutantes.

L'ovocyte de xénope est un outil couramment utilisé pour l'étude fonctionnelle des canaux et transporteurs exogènes mais il ne permet pas de purifier la protéine exogène. D'autre part, les perméabilités mesurées dans ce système (et dans les protéoliposomes reconstitués) sont des valeurs globales qui sont proportionnelles à la densité des protéines d'intérêt exprimées à la surface de la membrane. Des méthodes ont été décrites pour estimer le nombre de particules exogènes présentes sur la surface membranaire afin de calculer les perméabilités unitaires (voir prochains chapitres). Dans certains systèmes, il faut également tenir compte de la contribution éventuelle d'une protéine endogène ou d'un mauvais adressage à la membrane.

L'avantage de la levure et de la bactérie est de pouvoir également produire la protéine en grande quantité pour la purifier ensuite et la reconstituer dans des protéoliposomes pour des études fonctionnelles ou structurales ultérieures. La mise au point de l'expression des aquaporines dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été effectuée au laboratoire pour AQP1. Ces travaux montrent que la protéine est fonctionnelle mais elle ne semble pas présenter de glycosylation (Laizé *et al.*, 1995). Ce système d'expression a été utilisé par la suite pour l'expression d'AQP2 (Coury *et al.*, 1998).

La protéine AQP0 a été surexprimée dans la bactérie *Escherichia coli* (Dilsiz et Crabbe, 1995). Les cellules d'insectes Sf9 ont aussi été utilisées pour exprimer et produire une AQP4 fonctionnelle, qui peut être reconstituée dans les protéoliposomes. Ce système aboutit à une quantité d'environ 0,11 mg d'AQP4 par litre de culture (Yang *et al.*, 1997). La méthode de production de protéines MIPs dans les systèmes d'expression hétérologue doit encore être améliorée puisque la quantité de protéines obtenue ne permet que la reconstitution dans des protéoliposomes car elle est inférieure au milligramme. Récemment, AQPZ a été surexprimée dans son système d'expression homologue (*Escherichia coli*) et a permis la production d'une quantité suffisante d'AQPZ, 2,5 mg par litre de culture, pour l'obtention de cristaux (Borgnia *et al.*, 1999; Scheuring *et al.*, 1999).

Les analyses fonctionnelles dans différents systèmes sont donc complémentaires, elles permettent de confirmer un résultat. Cependant, certaines formes mutantes de canaux hydriques ne sont pas stables ou adressées à la membrane plasmique de l'ovocyte (Jung *et al.*, 1994b; Lagree *et al.*, 1998b; Mulders *et al.*, 1997a; Mulders *et al.*, 1997b; Preston *et al.*, 1993). Le choix d'un autre système d'expression peut donc être une alternative comme c'est le cas d'un mutant de l'aquaporine de *Cicadella viridis* (AQP_{cic}) qui n'est pas exprimée dans l'ovocyte mais qui l'est dans la levure (Lagree *et al.*, 1998b).

II.B.2. Controverses au sujet de la sélectivité

MIPs de mammifères:

Initialement, la détermination de la fonction d'AQP0 montrait qu'elle était un **canal ionique** dépendant du voltage, également perméable aux petites molécules (Girsh et Perrachia, 1985; Peracchia et Girsch, 1989; Shen *et al.*, 1991). Cette fonction n'a pas été confirmée après expression dans l'ovocyte de xénope où elle apparaissait plutôt former un canal hydrique avec une P_f 4 à 12 fois plus importante que celle des ovocytes contrôles (Chandy *et al.*, 1997; Mulders *et al.*, 1995; Zampighi *et al.*, 1995).

Une autre équipe a reporté qu'AQP0 permettait également le passage de **glycérol** (Kushmerick *et al.*, 1998). Un groupe n'a cependant pas observé de transport d'eau à travers AQP0 exprimée dans l'ovocyte de xénope ou reconstituée dans les protéoliposomes (Verbavatz *et al.*, 1994). Par ailleurs, les mêmes auteurs n'ont pas observé la fonction de canal hydrique admise d'AQP3 dans les mêmes conditions (Ma *et al.*, 1994).

Certaines équipes ont montré une sélectivité moins restreinte d'**AQP1**. Son expression dans les ovocytes de xénope augmenterait la perméabilité au **CO₂** des membranes (Nakhoul *et al.*, 1998), celle-ci serait également sensible à l'application de pCMBS (Cooper et Boron, 1998) et d'HgCl₂ (Prasad *et al.*, 1998). Un transport de **glycérol** a été observé dans des protéoliposomes reconstitués avec les AQP1 humaine, de rat et de grenouille (Abrami *et al.*, 1995b). L'AQP1 humaine et certains de ses mutants (C189S, H108A, et H209A) ainsi que l'**AQP2** humaine se sont aussi montrées perméables au glycérol lorsqu'elles étaient exprimées dans l'ovocyte de xénope (Abrami *et al.*, 1996). Tous les mutants d'AQP1 transportent le glycérol, mais un seul ne transporte pas l'eau: AQP1 H209A. Il aurait été intéressant de voir si ce mutant était bien exprimé à la membrane plasmique, et dans la négative, si le transport de glycérol observé pourrait provenir d'une protéine endogène de l'ovocyte de xénope puisque personne n'a reproduit ces résultats. Des protéoliposomes contenant AQP1 ont une perméabilité à l'urée équivalente à celle des liposomes témoins montrant qu'AQP1 n'est pas perméable à l'urée (Abrami *et al.*, 1995b; Van Hoek et Verkman, 1992; Zeidel *et al.*, 1992). Par contre, la mesure de la perméabilité à l'urée à une étape précédant la reconstitution, c'est à dire sur des vésicules d'érythrocytes traitées au KI, montrent une perméabilité à l'urée élevée. Le traitement subséquent au NLS à 2% suffit apparemment à enlever les protéines responsables du transport d'urée présentes dans les membranes d'hématies (Van Hoek et Verkman, 1992). Il a été montré que des ovocytes de xénope exprimant AQP1 avaient non seulement une perméabilité hydrique augmentée après addition de **forskoline** (augmentant le taux d'AMPC) et de **8-bromo-AMPC** mais présentaient aussi une perméabilité accrue aux **cations** (Yool *et al.*, 1996). Ces expériences ont été effectuées par d'autres auteurs mais n'ont pas été reproduites (Agre *et al.*, 1997).

Il a été observé par Zeuthen *et al.* que la perméabilité hydrique à travers **AQP3** exprimée dans l'ovocyte de xénope variait entre **pH** 5,5 et 7, avec un P_f maximum à pH supérieur à 7 et une absence de P_f à pH inférieur à 5,5. Un effet sur la perméabilité au glycérol est aussi observé entre pH 5,8 et 6,25, avec une P_{gly} maximum à pH supérieur à 6,25 et une absence de P_{gly} à pH inférieur à 5,8. Dans la gamme de pH compris entre 5,8 et 6,2, le canal permet le passage de glycérol mais le passage d'eau est très faible. Les auteurs pensent qu'un modèle dans lequel les molécules d'eau et de glycérol traversent le pore par une succession de liaisons hydrogènes avec des résidus de la protéine possédant des groupes titrables avec un certain pK serait à envisager. Le glycérol pourrait donc entrer en compétition avec l'eau au niveau des sites en commun (Zeuthen et Klaerke, 1999).

Très récemment, il a été montré que des ovocytes exprimant **AQP6**, incubés avec 0,3 mM de mercure (qui est en général un inhibiteur) ou bien en présence d'un pH acide (4,0), présentaient non seulement une perméabilité hydrique élevée mais aussi un **courant ionique**. Le courant observé est plutôt sélectif pour les **anions**, mais la mutation K72E modifie la sélectivité du canal, favorisant le courant cationique (Yasui *et al.*, 1999a).

Afin de préciser la valeur des perméabilités unitaires et la sélectivité de certains canaux hydriques (AQP0 à 5), les protéines ont été étiquetées afin de quantifier équitablement l'expression à la membrane d'ovocytes par immunofluorescence à l'aide du même anticorps. Une hétérogénéité est observée: AQP4 possède une p_f bien supérieure à AQP2 et AQP3, et AQP0 semble être très peu perméable à l'eau, ces différences pourraient être attribuées à la longueur du pore (Meinild *et al.*, 1998b) (figure II.10). De plus, seule AQP3 est perméable au glycérol (Yang et Verkman, 1997). Une autre équipe a calculé les p_f d'AQP0 et d'AQP1 exprimées dans l'ovocyte de xénope à partir de P_f et de la densité des protéines membranaires exogènes à la surface des ovocytes grâce à la microscopie électronique après cryofracture. La capacité de transport d'eau est 100 fois plus puissante pour le canal AQP1 que pour le canal AQP0 (Chandy *et al.*, 1997; Zampighi *et al.*, 1995).



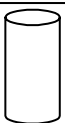
MIPs de plantes:

La fonction de **Nod26** n'était pas bien connue et elle semblait se comporter comme AQP0 en formant un **canal ionique** (Weaver et Roberts, 1992), mais elle s'est avérée être perméable à l'eau et au **glycérol** (Dean *et al.*, 1999). **Nt-TIPa** est surtout perméable à l'**urée** (Gerbeau *et al.*, 1999). **NtAQP1** est perméable au **glycérol** (Biela *et al.*, 1999).

Un modèle simple pour comprendre la sélectivité des canaux hydriques est le mécanisme d'exclusion par la taille, initialement proposé par Heller *et al.* en 1980 pour GlpF (Heller *et al.*, 1980). Ce modèle est basé sur l'hypothèse que si un soluté est capable de traverser le pore, le flux d'eau sera diminué en réponse à un gradient osmotique imposé par ce soluté, et pour un même soluté, plus le flux d'eau est diminué, moins le pore du canal discrimine entre l'eau et le soluté (Meinild *et al.*, 1998b). La mesure du coefficient de réflexion, σ , reflète la capacité ou l'incapacité des solutés à passer à travers le pore hydrique, c'est à dire à être réfléchis par la membrane ($\sigma=1$), ou à franchir cette membrane ($\sigma<1$). Si le flux d'eau J_v obtenu avec un composé imperméant est égal à $P_f \times \Delta\pi$ ($\Delta\pi$: différence de pression osmotique), alors, le flux d'eau J_v' obtenu avec un composé non imperméant sera égal à $P_f \times \Delta\pi \times \sigma$, avec σ inférieur à 1. Le coefficient de réflexion sera donc équivalent au rapport du flux d'eau mesuré en présence du composé perméant sur le flux d'eau mesuré en présence du composé imperméant.

La combinaison de la perméabilité hydrique unitaire et de la mesure de sigma pour le formamide peut donner une évaluation de la forme du pore des canaux hydriques (Meinild *et al.*, 1998b) (voir schéma suivant).

Figure II.10: Schéma de la forme supposée des pores de quelques canaux hydriques

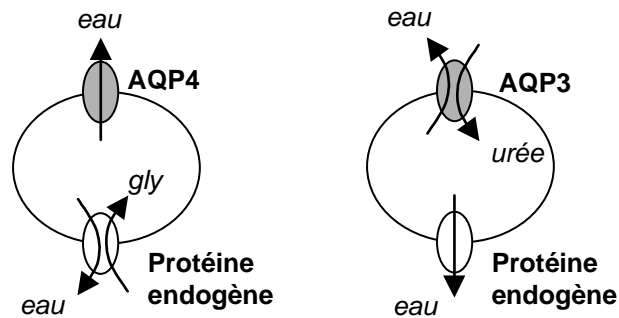
	$p_f =$	$p_f >$	$p_f <$
$\sigma_{\text{formamide}} = 1$	 AQP1 AQP2	 AQP4	
$\sigma_{\text{formamide}} < 1$			 AQP3

Une valeur de σ égale à 1 montre un pore de diamètre étroit comme c'est le cas pour AQP1, AQP2 et AQP4 mais la p_f d'AQP4 étant plus élevée, la longueur de son pore pourrait être plus petite. La valeur de σ d'AQP3 étant inférieure à 1 et sa p_f étant inférieure à celles d'AQP1 et d'AQP2, son pore serait plus large et plus long. D'après Meinild *et al.*, 1998b.

Cependant, l'existence de facilitateurs de glycérol non perméables à l'eau pourrait suggérer un mécanisme différent.

Pour les calculs de σ , les auteurs trouvent qu'AQP3 permettrait un passage important de formamide et de glycérol mais ne serait pas perméable à l'urée. D'autre part, AQP4 serait légèrement perméable au glycérol. Ces résultats ne sont pas en accord avec la littérature. Ces calculs ne tiennent pas compte d'éventuels transporteurs de solutés ou de canaux hydriques endogènes, qui pourraient expliquer ces valeurs de sigma obtenues. La figure ci-dessous montre une explication possible les valeurs de σ obtenues pour AQP3 avec l'urée et AQP4 avec le glycérol.

Figure II.11: Explication possible des valeurs de σ obtenues par Meinild *et al.* (1998) pour AQP3 et AQP4



La valeur inférieure à 1 pour le glycérol à travers AQP4 pourrait mettre en cause l'activité d'une protéine de l'ovocyte transportant l'eau et le glycérol, de même que la valeur de sigma égale à 1 pour l'urée à travers AQP3 pourrait impliquer un canal hydrique endogène de l'ovocyte sélectivement perméable à l'eau.

Des protéines ne faisant pas partie de la famille MIP se sont montrées perméables à l'eau comme le transporteur de glucose dépendant du sodium, SGLT1 (Loo *et al.*, 1996; Meinild *et al.*, 1998a), les échangeurs K^+/Cl^- (Zeuthen, 1994) ou lactate/ H^+ (Zeuthen *et al.*, 1996), ou le CFTR stimulée par l'AMPc (Hasegawa *et al.*, 1992).

II.B.3. Controverses au sujet de la régulation

MIPs de mammifères:

La **phosphorylation** de certaines protéines de la famille MIP avait déjà été décrite précédemment. Par exemple, la phosphorylation par la PKA sur la sérine 243 activait la fermeture du canal voltage-dépendant de la protéine **AQP0**, sa fonction de canal hydrique n'était alors pas connue (Ehring *et al.*, 1992).

L'incubation ou l'injection directe de **8-bromo-AMPc** (activant la PKA) (Patil *et al.*, 1997) ou de **forskoline** (Yool *et al.*, 1996) sur des ovocytes exprimant **AQP1** augmenterait

leur perméabilité hydrique, suggérant que l'augmentation d'activité de l'aquaporine-1 passe par un mécanisme mettant en jeu la voie de la **PKA**. La séquence consensus typique de phosphorylation des protéines, Arg-Arg-X-Ser/Thr, est absente dans l'AQP1, mais de nombreuses protéines phosphorylées par une protéine kinase dépendante de l'AMPc ne présente seulement que la séquence Arg-X-Ser qui pourrait être le site de phosphorylation sur AQP1 (Pearson et Kemp, 1991). Sur des cellules LLC-PK1 (cellules épithéliales de rein de porc) transfectées avec AQP2, la **vasopressine** induit une nette augmentation de l'expression à la membrane plasmique d'AQP2 ainsi qu'une élévation de la perméabilité hydrique. Lorsque la transfection a lieu avec AQP1, la vasopressine n'induit pas d'augmentation de la perméabilité hydrique (Katsura *et al.*, 1995). Parallèlement, aucune élévation de l'expression d'AQP1 n'a été observée dans le cortex, et dans les médullaires interne et externe de rein de rat auxquels on a administré de la vasopressine (Terris *et al.*, 1996). Les travaux de Jenq *et al.* ont montré que l'expression d'AQP1 endogène dans la lignée cellulaire mIMCD3 (cellules du canal collecteur de médullaire interne de souris) était induite par un milieu hypertonique contenant 400 mosm/l de **NaCl**. Un effet synergique de la vasopressine sur le NaCl est observé aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine (Jenq *et al.*, 1998).

Dans les cholangiocytes, l'insertion d'AQP1 à la membrane plasmique serait induite par la **sécrétine** (Marinelli *et al.*, 1997).

Par contre, l'application de l'**hormone peptidique natriurétique** qui joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie (formation d'urine hypertonique dans la médullaire rénale, production de liquide cébrospinal dans le cerveau et sécrétion de l'humeur aqueuse dans l'œil) bloque l'augmentation de perméabilité hydrique médiée par AQP1 (Patil *et al.*, 1997).

Une séquence consensus de phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA): Arg-Arg-Gln-**Ser**, se trouve en position 253 à 256 (Kuwahara *et al.*, 1995) de l'**AQP2**. Cette phosphorylation n'altère pas la fonction de canal hydrique (Lande *et al.*, 1996), mais au contraire, serait nécessaire à l'adressage d'AQP2 à la membrane apicale, dépendante de l'AMPc (Fushimi *et al.*, 1997). La vasopressine se fixe sur un récepteur V2, couplé à l'adénylate cyclase, situé sur la membrane basolatérale. L'augmentation d'AMPc induit la phosphorylation de protéines et l'adressage des vésicules contenant AQP2 à la membrane apicale. Les étapes de régulation de l'AQP2 par l'hormone antidiurétique mettraient en jeu différentes protéines. Certaines, en effet seraient colocalisées avec AQP2 dans les mêmes vésicules, comme la cellubrevine (Franki *et al.*, 1995) ou la syntaxine-4 (Mandon *et al.*, 1996). Le signal d'adressage d'AQP2 à la membrane apicale dans les cellules LLC-PK1 serait situé dans l'extrémité C-terminale puisque l'addition de la *GFP* (*green fluorescent protein*) à cette extrémité rend la protéine constitutivement exprimée aux membranes apicales et basolatérales (Gustafson *et al.*, 1998).

Dans le cortex et les médullaires interne et externe de rein de rat auxquels on a administré de la **vasopressine**, une augmentation d'expression d'**AQP3** a été observée (Terris *et al.*, 1996). Dans une lignée de cellules épithéliales humaines de voie aérienne, la dexaméthasone, un corticostéroïde, y induit l'expression d'AQP3 (Tanaka *et al.*, 1997). Dans les cellules pulmonaires, l'ovocyte de xénope et les cellules CHO, il a été montré une régulation de l'activité de l'AQP3 dépendante du CFTR en présence d'AMPc (Schreiber *et al.*, 1999).

Il a été observé une régulation par la PKC de l'activité d'**AQP4**. La sérine 180 dans la boucle D pourrait être le site de phosphorylation (Han *et al.*, 1998).

AQP6 aurait une activité de transport hydrique et de transport d'anions à pH acide (voir chapitre précédent) (Yasui *et al.*, 1999a).

La régulation possible de certains canaux hydriques par le pH a aussi été proposée par Engel *et al.* (Engel *et al.*, EMBO J., sous presse).

MIPs de batraciens:

Une augmentation de l'expression de **FA-CHIP** est observée dans la vessie de grenouille acclimatée à un environnement salé (Abrami *et al.*, 1995a).

MIPs de plantes:

Lorsque la sérine 262 de **NOD26** est phosphorylée par une protéine kinase dépendante du calcium, l'entrée de malate est stimulée (Miao *et al.*, 1992; Weaver et Roberts, 1992). La perméabilité hydrique d'une autre aquaporine présente chez les plantes, homologue à AQP1, **α -TIP**, est également stimulée par l'**AMPc** et la **forskoline** (Maurel *et al.*, 1995). **PM28A**, un canal hydrique d'épinard est régulé par la phosphorylation (Johansson *et al.*, 1998). Le stress osmotique induit l'augmentation des ARNm codant pour **BobTIP26-1** dans le chou-fleur (Barrieu *et al.*, 1999).

MIPs de microorganismes:

C'est par **Fps1** que la levure contrôlerait l'accumulation de glycérol (Luyten *et al.*, 1995; Tamas *et al.*, 1999). La délétion de la partie N-terminale induit la perte de régulation osmotique du canal (Tamas *et al.*, 1999).

Les organismes unicellulaires sembleraient s'adapter aux changements d'osmolarité extracellulaires non pas en transportant l'eau mais plutôt en transportant ou en produisant des solutés. Certains postulent que les canaux hydriques de ces organismes ne seraient pas localisés dans les membranes plasmiques mais dans les membranes de compartiments internes (comme les protéines TIPs dans le tonoplaste des plantes) pour minimiser l'établissement du gradient osmotique entre ces compartiments et le cytosol. La localisation précise d'AQPZ dans la bactérie et des aquaporines de levure n'ont pas été déterminées.

Au cours de l'évolution, les aquaporines des organites cellulaires ont pu avoir accès à la membrane plasmique par fusion membranaire grâce à l'exocytose.

Ainsi, la colocalisation d'AQP3 et d'AQP4 peut s'expliquer de cette façon. Alors qu'AQP3 aurait toujours été localisée à la membrane plasmique, AQP4 aurait trouvé sa place après exocytose des endosomes, tout comme AQP2 après activation par la vasopressine. C'est une supposition d'Ishibashi *et al.* (Ishibashi et Sasaki, 1998).

II.B.4. Comparaison des structures primaires

Un arbre phylogénétique réalisé sur plusieurs protéines de la famille MIP a permis de distinguer les trois classes de protéines décrites précédemment (Park et Saier, 1996).

La comparaison des structures primaires suivante est restreinte volontairement aux protéines MIP de mammifères qui ne comportent que des aquaporines et des aquaglycéroporines. Il ne faut cependant pas omettre la troisième sous-famille composée des facilitateurs de glycérol, que l'on ne trouve pour le moment que chez les microorganismes, mais qui est aussi intéressante puisque ses membres ne sont pas perméables à l'eau.

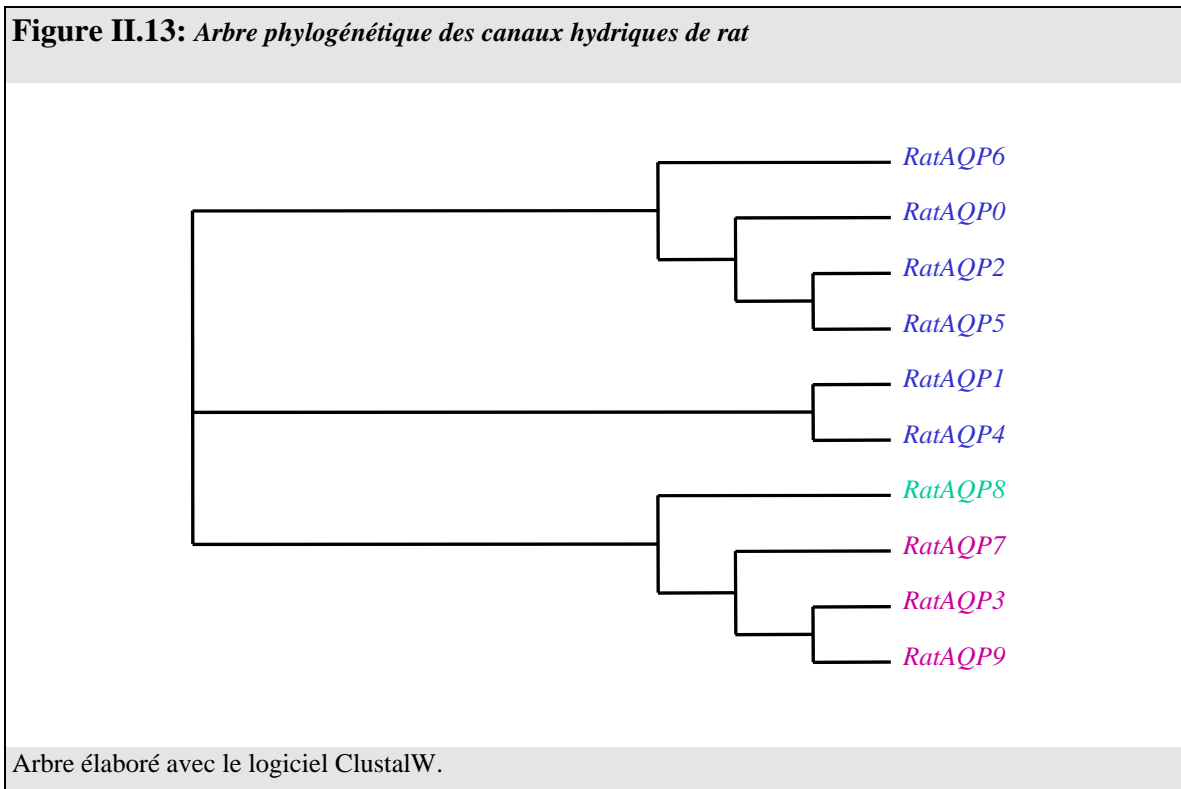
L'alignement de séquence suivant effectué entre les canaux hydriques de rat montre des différences de taille dans certaines parties, notamment dans les boucles C et E. On note le rassemblement des aquaporines (0, 1, 2, 4, 5, 6) et des aquaglycéroporines (3, 7, 9). AQP8 est isolée mais possède une plus forte homologie avec l'AQP7. Il est vrai que suivant l'espèce, sa sélectivité varie.

Figure II.12: Alignement des canaux hydriques de rat

		TM1	
RatAQP2	-----MWELRS-----IAFSRAVLAEFLATLLFVFFGLGSAL--QW	34	
RatAQP5	-----MKKEVCS-----LAFFKAVFAEFLATLIFVFFGLGSAL--KW	35	
RatAQP0	-----ELRS-----ASFWRIFAEEFFATLFYVFFGLGSSL--RW	32	
RatAQP6	-----MEPGLCNRAYLLVGGLWTAISKALFAEFLATGLYVFFGVGSVL--PW	45	
RatAQP1	-----MASE-IKK-----KLFWRAVVAEFLAMTLFVFVISIGSALGFNY	37	
RatAQP4	MSDGAAARRWGKCGPPCSRESIMVAFKGVWT-----QAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSVGSTI--NW	59	
RatAQP3	-----MGRQKELMNR-CGEMLHIRYRLLRQALAECLGTLILVMFGCGSVAQVVL	48	
RatAQP9	-----MPSEKDGAKKSLMQRALAKSRIAKETLSEFLGTFIMIVLGCSSIAQAVL	49	
RatAQP7	-----MAG--SVLEN---IQSVLQKTWVREFLAEFLNTYVLMVFLGSGVAHML	44	
RatAQP8	-----MSGEQTPMCSMDLREIKKETNMADSYHGMSWYEQYIQPCVVELLGSALFIFIGCLSVIE-NS	62	
		: * : . : . *	
A	TM2	B	
RatAQP2	ASS----PPSVLQIAVAFGLGIGILVQALGHVSGAHINPAVTVACLVGCHVSFLRAAFYVAAQLLGAVAG	100	
RatAQP5	PSA-----LPTILQISIAFGLAIGTLAQALGPVSGGHINPAITLALLIGNQISLLRAVFYVAAQLVGAIAG	101	
RatAQP0	APG----PLHVLQVALAFGLALATLVQTVGHSIAHVNPAVTFAFLVGSQMSLLRAFICYIAAQLLGAVAG	98	
RatAQP6	PVA-----LPSVLQVAITFNLATATAVQISWKTSGAHINPAVTLAYLVGSHISLPRAVAYIAQLGAVAG	111	
RatAQP1	PLERNQTLVDNVKVSIAFGLSIATLAQSVGHSIAHVNPAVTLGLLLSCQISILRAVMYIIAQCVGAIVA	108	
RatAQP4	GGSEN-PLPVDMLVLSLFCGLSIATMVQCFCGHISGGHINPAVTVMVCTRKISIAKSVFYITAQCLGAIIG	129	
RatAQP3	SRGT----HGGFLTINLAFGFAVTLAILVAGQVSGAHLNPAVTFAMCFLAREPWIKLPITYTLAQTGLAFLG	115	
RatAQP9	SRER----FGGITINIGFASAVVMALYVTFGISGGHINPAVSFAMCAFGRMWFKFPFYVGAQFLGAFVG	116	
RatAQP7	G-ER----LGSYLGVNLGFGFVMTGIHVAGGISGAHNMNPAVTFTNCALGRMAGRKFPYIVLQQLGSLFLA	110	
RatAQP8	P-----NTGLLQPALAHGLALGLIIATLGNISGGHFNPAVSLAVTLVGGLKTMLLLPYVWVSQFLFGGMIG	126	
	: : . . *	* . * . .	
TM3	C	TM4	D
RatAQP2	AAILHEITPVEIRGDLAVNALHNN-----ATAGQAVTVELFLTMQLVLCIFASTDERRGDN	156	
RatAQP5	AGILYWLAPLNARGNLAVNALNNN-----TTPGKAMVVELILTFQLALCIFSSDTSRRTSP	157	
RatAQP0	AAVLYSVTPPAVRGNLALNTLHAG-----VSVGQATVEIFLTLQFVLCIFATYDERNRGR	154	
RatAQP6	AALLYGVTPGGVRETIGVNVVHNS-----TSTGQAVAVELVLTQLVLCVVFASMDSRQT--	165	
RatAQP1	SAILSGITSSLENSLGRNDLARG-----VNSGQGLGIEIIGTLQLVLCVLATTDRRRRDL	164	
RatAQP4	AGILYLVTPPSVVGGLGVTTVHGN-----LTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDV	185	
RatAQP3	AGIVFGLLYDAIWAFAAGNELVVGPNGTAGIFATYPSGHLDMVNGFFDQFIGTAALIVCVLAIVDPYNNPV	186	
RatAQP9	AATVFGIYYDGLMAFAGGKLLVVGENATAFIFATYPAPFISTPGAQVVDQVSTMFLLLIIVFAMFDSRNLGV	187	
RatAQP7	AATTYLIFYGAINHYAGETLLVTGPKSTANIFATYLPEHMTLWRGFVDEVFVTGMLQLCIFAITDKLNSPA	166	
RatAQP8	AALAKVVSPEERFWNASGAFAIVQ-----EQEQVAEALGVEIVMTMLLVAVCMGAVNEKTMG	185	
	: : . .	. : . * : . .	
TM5	E	TM6	
RatAQP2	-LGSPALSIGFSVTGLHLLGIYFTGCSMNPARSLAPAVVTGKFD-DHWVFWIGPLVGAIIGSLLYNYLLFP	225	
RatAQP5	-VGSPALSIGLSVTGLHVLGIYFTGCSMNPARSFGPAVVMNRFSPSHWVFWVGPIVGAMLAAILFYLLFP	227	
RatAQP0	-MGSVALAVGFSLTGLHFLGMYTTGAGMNPARSFAPAILTRNFS-NHWVYVWVGPIIGGGLGSLLYDFLLFP	223	
RatAQP6	-LGSPAAMIGTSVALGHLIGIYFTGCSMNPARSFGPAVIVGKFA-VHWIFWVGPLTGAVLASLIYNFILFP	234	
RatAQP1	-GGSAPLAIGLSVALGHLAIDYTGGINPARSFGSAVLTRNFS-NHWIFWVGPIIGSALAVLIYDFILAP	233	
RatAQP4	-TGSAVALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWE-NHWIYVVGPIIGAVLAGALYEVFCP	254	
RatAQP3	PRGLEAFTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAG---WGSEVFTTGQNNWWWPIVSPLLGS	254	
RatAQP9	PRGLEPVVIGLLIIVLSCSLGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAG---WGFEVFTVGNNFWWIPVVGPMIGA	255	
RatAQP7	LQGTEPLMIGILVLCVGLVSLGMNTGYAINPSRDLPFRFFTFIAG---WGKKVFSAGNNWWWVPPVAPLLGA	234	
RatAQP8	--PLAPFSIGFSVIVDILAGGIGISGACMNPARAFGPAVMAGYWD-FHWIYWLGLLLAGLFLVGLLIRLFIGD	253	
	. : * : : : * : : . .	* : . : : .	
RatAQP2	SAKSLQERLAVLKG---LEPDTDWEEREVERRRQSVLEHSPQSLPRGSKA-----	271	
RatAQP5	SSLSLHDRVAVVKG---YEPEEDWEDHREERKKTIELTAH-----	265	
RatAQP0	RLKSVSERLSILKG---ARP-SDSNGQPEGTGEPVELKTQAL-----	261	
RatAQP6	DTKTVAQRLAILVGTTKVEKVVDLEPQKKESQTNSEDETVSV-----	276	
RatAQP1	RSSDFTDRMKVWTSG-QVEEYD---LDADDINSRVE-----MKPK-----	269	
RatAQP4	-DVELKRRRLKEAFSK-AAQQTGKSYMEVEDNRSQVETEDLILKPGVVHVIDIDRGDEKKGKDSSEVLSSV	323	
RatAQP3	IGGVFVYQLMIGCHLEQPPPPSTEAEENVKLAHMKHKEQI-----	292	
RatAQP9	FLGGLIYILFIQMHHSKLDPMKAEPSENNLEKHLSVIM-----	295	
RatAQP7	YLGGIYVYGLLI--HAG-IPPQGS-----	269	
RatAQP8	EKTRLILKSR-----	263	

Alignement de séquence obtenu grâce au logiciel ClustalW. Les passages transmembranaires sont représentés en gris. "*": résidus strictement conservés, ":"substitutions conservées, ".": substitutions semi-conservées.

L'arbre phylogénétique représenté ci-dessous montre un regroupement des aquaporines de rat au sommet de l'arbre (AQP0, -1, -2, -4, -5, -6) et des aquaglycéroporines de rat à la base (AQP3, -7, -9). Notons que la position de l'AQP8 de rat se situe dans le groupe des aquaglycéroporines.



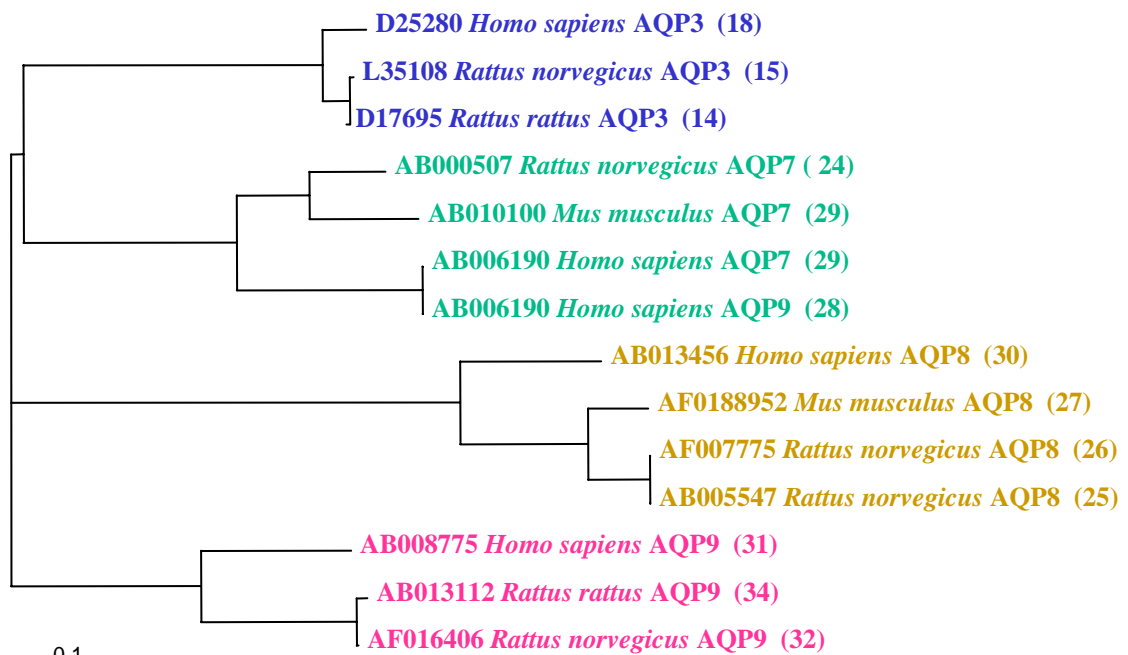
La localisation chromosomique des aquaporines humaines révèle que AQP0, AQP2, AQP5 et AQP6 sont colocalisées sur le même chromosome 12q13. De plus, leur séquence en acides aminés présente une grande similitude, suggérant qu'ils dérivent de la duplication d'un même gène (Ma *et al.*, 1996a).

Nous avons noté des différences fonctionnelles inter-espèces dans les canaux hydriques clonés récemment, en particulier pour AQP8 et AQP9.

En effet, alors que les AQP8 humaines et de rat sont sélectivement perméables à l'eau (Ishibashi *et al.*, 1997b; Koyama *et al.*, 1998; Koyama *et al.*, 1997), l'AQP8 de souris est aussi perméable à l'urée (Ma *et al.*, 1997) mais ces résultats fonctionnels sont trop récents et nécessitent d'être reproduits. On observe de plus une incompréhension au niveau de l'AQP9 puisqu'une des AQP9 clonée chez l'humain n'est pas perméable au glycérol (Ishibashi *et al.*, 1998a). Très récemment, les travaux de Tsukaguchi *et al.* sur l'AQP9 humaine ont pourtant montré une fonction similaire à celle d'AQP9 de rat (Tsukaguchi *et al.*, 1998) avec une perméabilité à de nombreux petits solutés incluant le glycérol (Tsukaguchi *et al.*, 1999).

L'arbre phylogénétique ci-dessous a été réalisé grâce aux alignements des séquences des aquaglycéroporines dont le numéro d'accession a été fourni par les auteurs.

Figure II.14: Arbre phylogénétique des aquaglycéroporines et des AQP8



Les numéros d'accession de chaque protéine sont indiqués. Les numéros entre parenthèses correspondent aux références indiquées dans le tableau I.2.

On remarque que l'AQP9 humaine clonée par Kuriyama *et al.* en 1997 est la même protéine que l'AQP7 humaine clonée en 1998 par Ishibashi *et al.*, elles ont aussi le même numéro d'accèsion AB006190. Ceci vient du fait que les auteurs ont trouvé seulement 68% d'identité entre cette protéine humaine (342aa) et l'AQP7 de rat (269aa), ce qui est peu commun, puisqu'en général, l'identité de séquence est de l'ordre de 90% entre deux espèces différentes. Cette différence n'est pas attribuée à la longueur des séquences N et C-terminales (Ishibashi *et al.*, 1998b). Les AQP8 de rat AF007775 et AB005547 sont également identiques.

L'alignement de séquence ci-dessous réalisé sur les aquaglycéroporines et AQP8 de mammifères montre que pour une même protéine, des différences inter-espèces existent dans toutes les régions de la protéine et surtout dans les séquences N et C terminales. On note des régions relativement bien conservées comme le 1^{er} et le 6^{ème} passages transmembranaires ainsi que la boucle B.

En général, il existe peu de différences entre le rat et la souris, ce qui se comprend aisément. L'AQP8 possède beaucoup de divergences avec les aquaglycéroporines, tant au niveau de la taille de certains segments (boucles C et E), qu'au niveau de la composition en acides aminés (presque toutes les parties sauf le début de la boucle B et le début de la boucle E).

```

rnorvAQP3 (15) -----MGRQKELMNRCGEMLHIRYRLRQALAECLGLTLILVMFGCGSVAQVVL SRGTHG 54
rratAQP3 (14) -----MNRCEMHLIRYRLRQALAECLGLTLILVMFGCGSVAQVVL SRGTHG 57
haQP3 (18) -----MGRQKELVSRCGEMLHIRYRLRQALAECLGLTLILVMFGCGSVAQVVL SRGTHG 54
raqp7 (24) -----MAGSVLENIQSVLQKTWVREFLAELFNTYVLMVFGLGSVAHMLGE--RLG 49
saqp7 (29) -----MAPRSVLETIQSVLQKNMVREFLAEFLSTYVMMVFGLGSVAHMLGE--NSG 50
haqp7 (29) ---MVQASGHRSTRSGSKMVSWSVIAKIQEILQRKMVREFLAEFMSTYVMMVFGLGSVAHMLNK--KYG 65
rrataqp9 (34) -----MPSEKDGAKKSLMQRLALKSRIAKETLSEFLGTFTIMIVLGCCSSIAQAVLSRERFG 55
rnorvaqp9 (32) -----MPSEKDGAKKSLMQRLALKSRIAKETLSEFLGTFTIMIVLGCCSSIAQAVLSRERFG 55
haqp9 (31) -----MQPEGAEEKGSKFKQRLVLKSSLAKETLSEFLGTFTILIVLGCGCVQAAILSRGRFG 55
saqp8 (27) MSGEQTPMCSDMDLPEVKVKS--MAGRCSRFWYEQQVQPCIVELVGSA LFIFIGCLSVIENSPT--- 62
raqp8 (26) MSGEQTPMCSDMDLREIKGKETNMADSYHGMSVEYYQYQPCVELLGSALFIFIGCLSVIENSPT--- 65
haqp8 (30) -MSGEIAMCEPEFGNDKAREPS-VGGRWRWSWYERFVQPCVELLGSALFIFIGCLSVIENGTD TDT--- 63
      :   : *   : : : : : *   :   .

rnorvAQP3 (15) GFLTINLAFGFAVTLLAILVAGQVSGAHLNPAVT FAMCF LAREPWIKLP IYT LAQT LG AFLGAGIV FG LY 123
rratAQP3 (14) GFLTINLAFGFAVTLLAILVAGQVSGAHLNPAVT FAMCF LAREPWIKLP IYT LAQT LG AFLGAGIV FG LY 116
haQP3 (18) GFLTINLAFGFAVTLLGILIAQGVSGAHLNPAVT FAMCF LAREPWIKLP IYT LAQT LG AFLGAGIV FG LY 123
raqp7 (24) SYLGVNLGFGFGVTMGIVH VAGGISGAHM NPAVTF TN CALGR MTA GRKFPI YV LG FLGSFLAAATTYL IF 118
saqp7 (29) SYLGVNLGFGFGVTMGVHV VAGGISGAHM NAAVTF TN CALGR MTWK KFPVYV LG FLGSFSAAATTYL IF 119
haqp7 (29) SYLGVNLGFGFGVTMGVHV VAGGISGAHM NAAVTF AN CALGR VPWRK FPFVYV LG FLGSFLAAATTYL S LF 134
rrataqp9 (34) GIITINIGFASAVVMALYVTFGISGGHINPAVS FAM CVFRMEWF KFPFYV GA QFLG AFVGAAT VF GIY 124
rnorvaqp9 (32) GIITINIGFASAVVMALYVTFGISGGHINPAVS FAM CFGRMEWF KFPFYV GA QFLG AFVGAAT VF GIY 124
haqp9 (31) GVITINVGF SMAVAMA IYV AGGVSGGHINPAV SLAM CLFGRMKWFKLP FYV GA QFLG AFVGAAT VF GIY 124
saqp8 (27) GLLQPALAHGLALGLI IATLGNISGGHFNP AVSLAVTV IGGLKTM LLIPYW ISQLFGGLIGAALAKVVS 131
raqp8 (26) GLLQPALAHGLALGLI IATLGNISGGHFNP AVSLAVTV IGGLKTM LLIPYWVSWQLFGGLIGAALAKVVS 134
haqp8 (30) GLLQPALAHGLALGLVIATLGNISGGHFNP AVSLAAMLIGGLNLV ML LPYWISQLFGGLMGAALAKVVS 132
      . :   : . . . : : : : ** . * . * . : :   . :   *   . *   : * . :   . :   :

rnorvAQP3 (15) YDAIWAFAGNELVSGPNGTAGIFATYP SGHLD MVNGFFDQDFIGTAALIVC VLAIVDPYNNPVPRGLEA 192
rratAQP3 (14) YDAIWAFAGNELVSGPNGTAGIFATYP SGHLD MVNGFFDQDFIGTAALIVC VLAIVDPYNNPVPRGLEA 185
haQP3 (18) YDAIWHFADNQLFVSGPNGTAGIFATYP SGHLD MINGFFDQDFIGTASLIVC VLAIVDPYNNPVPRGLEA 192
raqp7 (24) YGAINHYAGETLLLV TGPKSTANIFATYL PEHMTLWR GFVDE FVTGM LQLCIFAITDKL NSPALQGTEP 187
saqp7 (29) YGAINHFAAGDLLLV TGSKATANIFATYL PEYMTLWR GFLEA FVTGM LQLCLFAITDKL NSPALQGTEP 188
haqp7 (29) YTAILHFSGGQLMVTGP VATAGIFATYL PDHMTLWR GFLEA WLTGM LQLCLFAITDQENN PALPGTEA 203
rrataqp9 (34) YDGLMAFAGGKLLV VGENATAFIFATYP APFI STPGAFVDQVVSTM FLLLIVF AMFDSRN LGVPRGLEP 193
rnorvaqp9 (32) YDGLMAFAGGKLLV VGENATAFIFATYP APFI STPGAFVDQVVSTM FLLLIVF AMFDSRN LGVPRGLEP 193
haqp9 (31) YDGLMSFAGGKLLV GENATAHIFATYPAPYLSLANAFADQVVM TMLLIIVFAIFDSRN LGAPRGLEP 193
saqp8 (27) PEERFWNASGA AFAIVQ-----EQEQVAEALGIEIILTMLLV LAVCMGAVNEKT MGPP--LAP 186
raqp8 (26) PEERFWNASGA AFAIVQ-----EQEQVAEALGVEIVMTMLLV LAVCMGAVNEKT MGPP--LAP 189
haqp8 (30) PEERFWNASGA AFAIVTQ-----EQQVAGALVAEII LT TL LALAVCMGAINEKTKGP--LAP 187
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

rnorvAQP3 (15) FTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGSEVFTTGQNWWWVIPV SPLLSIGGVFVY 261
rratAQP3 (14) FTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGSEVFTTGQNWWWVIPV SPLLSIGGVFVY 254
haQP3 (18) FTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGS AVFTTGQHWWVIPV SPLLSIAGVFVY 261
raqp7 (24) LMIGILVCVLGVSLGMNTGYAINPSRDLP PRFFT FIAGWGKQVFSAGNNWWWVPV VAPLLGAYLGGIVY 256
saqp7 (29) LVIGILVTVLGVSLGMNSGYAINPSRDLP PRFFT FIAGWGKQVFRAGNNWWWVPV VAPLLGAYLGGIVY 257
haqp7 (29) LVIGILVTVLGVSLGMNTGYAINPSRDLP PRIFT FIAGWGKQVFSNGENWWWVPV VAPLLGAYLGGI IY 272
rrataqp9 (34) VVISLLIIIVLSCSPGLNSGCAMPARDLSPRLFTALAGWGFEVFTVGNNFWWI PVVGP MIGAFLGGLIY 262
rnorvaqp9 (32) VVIGLLIIIVLSCSLGLNSGCAMPARDLSPRLFTALAGWGFEVFTVGNNFWWI PVVGP MIGAFLGGLIY 262
haqp9 (31) IAIGLLIIIVIASLGLNSGCAMPARDLSPRLFTALAGWGFEVFRAGNNFWWI PVVGPLV GAVIGGLIY 262
saqp8 (27) FSIGFSVIVDILAGGSI SACMNPARA FGP-----AVMAGYWD FH WIYWL GP LLAGLFVGLLI 244
raqp8 (26) FSIGFSVIVDILAGGSI SACMNPARA FGP-----AVMAGYWD FH WIYWL GP LLAGLFVGLLI 247
haqp8 (30) FSIGFAVTVDILAGGPVSGGCMNPARA FGP-----AVVANHWNFH WIYWL GP LLAGL L VGLLI 245
      . : . : : : : : * : * : *** : * :   * :   : * : : * : : . : :

rnorvAQP3(15) QLMIGCHLEQPPPSTEAE NVKL AHMKHEQI----- 292
rratAQP3(14) QLMIGCHLEQPPPSTEAE NVKL AHMKHEQI----- 285
haQP3(18) QLMIGCHLEQPPSNSEENVKL AHVKHEQI----- 292
raqp7(24) LGLIHAGIPPQGS----- 269
saqp7(29) LGLIHPSIPQDPQRLENFTAR DQKV TAS YKNAASAN-----ISGSVPLEHF 303
haqp7(29) LVFIIGSTIPREPLKLED SVAYEDHG ITVLPKMGSH EPTISPLTPVSVSPANRSSVHPAPP LHESMALEHF 342
rrataqp9(34) ILFIQMHHSKLDPDMKAEP SENNLEKHELSVM----- 295
rnorvaqp9(32) ILFIQMHHSKLDPDMKAEP SENNLEKHELSVM----- 295
haqp9(31) VLVIETHHPEPDSVFKAEQSEDKPEKYELSVM----- 295
saqp8(27) RLLIGDEKTR LILKSR----- 261
raqp8(26) RLFIGDEKTR LILKSR----- 263
haqp8(30) RCFI GDGKTR LILKAR----- 261
      *
```

Alignement de séquence obtenu grâce au logiciel ClustalW. Les passages transmembranaires sont représentés en gris. "*": résidus strictement conservés, ":":substitutions conservées, ".": substitutions semi-conservées.

II.B.5. Indépendance des monomères d'AQP1

Il a été démontré que dans la membrane, l'aquaporine-1 possède une structure tétramérique, mais on ignorait si l'eau passait par un pore unique au centre du tétramère ou si chaque monomère possédait un pore.

Pour répondre à cette question, un test de coopérativité entre l'AQP1 sauvage et l'AQP1 mutée C189S devenue insensible au mercure mais toujours fonctionnelle a été mis au point. La coexpression de ces deux protéines dans l'ovocyte de xénope aboutit à une perméabilité hydrique approchant la somme des perméabilités hydriques obtenues dans le cas d'injections indépendantes. L'application de mercure n'inhibe que de 50% la fonction. Les auteurs ont donc imaginé que les sous-unités se sont associées pour former un complexe hétéromérique et que chaque sous-unité constituait un pore indépendant des autres (Preston *et al.*, 1993). Des expériences équivalentes ont été faites avec AQP1 C189S et AQP1 C189G, fonctionnelles également (Zhang *et al.*, 1993b) démontrant l'indépendance des monomères. L'hypothèse a été supportée par van Hoek qui a démontré grâce à l'inactivation par radiations que l'unité fonctionnelle avait une taille de 30 kDa correspondant à celle d'un monomère (Van Hoek *et al.*, 1991).

Cependant, il n'est pas évident de relier la valeur de la P_f avec l'association des monomères dans ce type d'expériences. De plus, il n'est pas possible de contrôler la formation éventuelle d'homotétramères. Une approche plus correcte est de forcer la formation des oligomères voulus. Ainsi, la construction d'un dimère sauvage-sauvage d'AQP1 à une P_f équivalente à celle obtenue avec une double quantité de monomère sauvage. Par contre, des dimères sauvage-mutants non fonctionnels (C189W) sont fonctionnels, montrant ainsi que la présence du mutant non-fonctionnel n'inactive pas la fonction du monomère sauvage. Les auteurs concluent que la sous-unité seule est capable de transporter l'eau (Shi *et al.*, 1994). Leurs résultats ont été renforcés par l'effet du mercure sur des ovocytes exprimant des dimères constitués d'AQP1 sauvage et du mutant insensible au mercure (C189S).

La perméabilité hydrique de tels ovocytes est inhibée d'environ 44%, c'est à dire de moitié par rapport à la perméabilité des ovocytes exprimant la construction dimérique sauvage-sauvage. On peut cependant également penser qu'il pourrait y avoir formation de tétramères par association des dimères et que le pore se situerait à l'intersection de deux monomères sauvages.

II.B.6. Implication de certains résidus dans la fonction, la structure ou l'adressage

Le laboratoire de Nijmegen s'est investi dans la détermination de la sélectivité des aquaporines en mesurant la fonctionnalité de chimères construites entre **AQP0** et **AQP2** dans lesquelles les boucles B et E ont été inversées. La plupart des chimères n'arrivent pas à la membrane plasmique. Par contre, l'introduction de la boucle B d'AQP0 dans AQP2 ne réduit pas la perméabilité d'AQP2 et la boucle E d'AQP2 insérée dans AQP0 n'augmente pas sa perméabilité, indiquant que d'autres parties de la protéine sont importantes dans la détermination des caractéristiques du canal (Mulders *et al.*, 1998b).

Une autre série de chimères a été construite à partir d'**AQP0** et d'**AQP1**: la séquence C-terminale d'AQP0 n'est pas responsable de sa diminution de fonction et le remplacement de certaines parties d'AQP0 par celles d'AQP1 n'augmente pas non plus sa fonction (Mulders *et al.*, 1995).

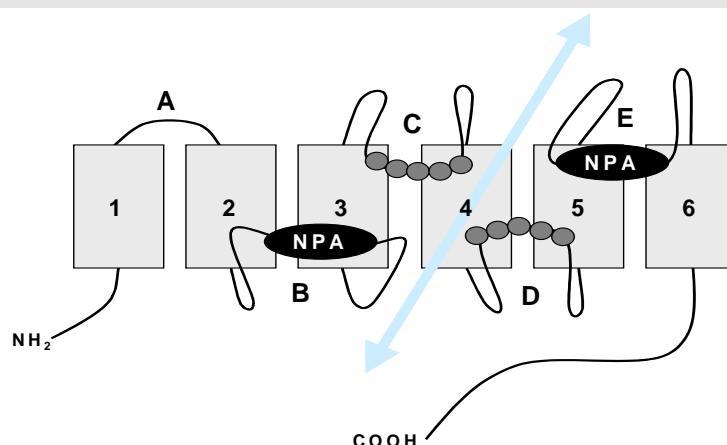
Il a été vérifié qu'**AQP2** était formée de 6 segments transmembranaires (Bai *et al.*, 1996). Le résidu responsable de l'inhibition par les agents mercuriels dans l'AQP2 de rat est la cystéine 181, puisque le mutant AQP2-C181S est fonctionnel et insensible au mercure dans l'ovocyte de xénope (Bai *et al.*, 1996). Une autre équipe a cependant démontré que ce même mutant d'AQP2 chez le rat et l'humain, ainsi que le mutant C181A d'AQP2 chez le rat, n'étaient pas adressés à la membrane de l'ovocyte (Mulders *et al.*, 1997b). Par ailleurs, la glycosylation d'AQP2 n'est pas essentielle pour son adressage à la membrane plasmique (Baumgarten *et al.*, 1998). Bien qu'**AQP4** ne soit pas sensible au

mercure, les mutations en cystéine des résidus en position 70, 71, 72, 73 et 189 rend AQP4 sensible au mercure.

De plus, les mutations consistant à placer un tryptophane à la place de la glycine 72 (boucle B) ou de l'alanine 188 (boucle E), rend la protéine non fonctionnelle, confirmant l'hypothèse que ces boucles sont impliquées dans la formation du pore (Shi et Verkman, 1996). L'augmentation d'activité d'**AQP6** par le mercure impliquerait les cystéines 155 et 190, et la mutation du résidu lysine 72 en glutamate inverse la sélectivité du pore pour les ions (Yasui *et al.*, 1999a).

Le remplacement de la boucle C ou E d'**AQP2** (aquaporine de mammifère) par la partie correspondante de **GlpF** (transporteur de glycérol de *E. coli*) abolit la perméabilité hydrique indiquant la mise en jeu de ces boucles dans la formation du pore hydrique. Les boucles de GlpF ne sont cependant pas suffisantes pour former un pore permettant le passage de glycérol puisque la perméabilité au glycérol de la chimère est très faible (communication personnelle). D'autre part, la mutation A65C d'AQP2 correspondant à la mutation A73C d'AQP1 ne rend pas la protéine sensible au mercure et l'insertion de quelques acides aminés ou la présence d'une glycosylation artificielle dans les boucles B et E n'empêche pas sa fonction. Les auteurs en ont conclu que le modèle du sablier n'était pas un modèle valable pour l'AQP2 et que la contribution des boucles C et D était importante dans la formation du pore hydrique (Bai *et al.*, 1996). Ils en ont déduit le modèle suivant:

Figure II.16: Modèle proposé pour AQP2 par Bai et al., 1996



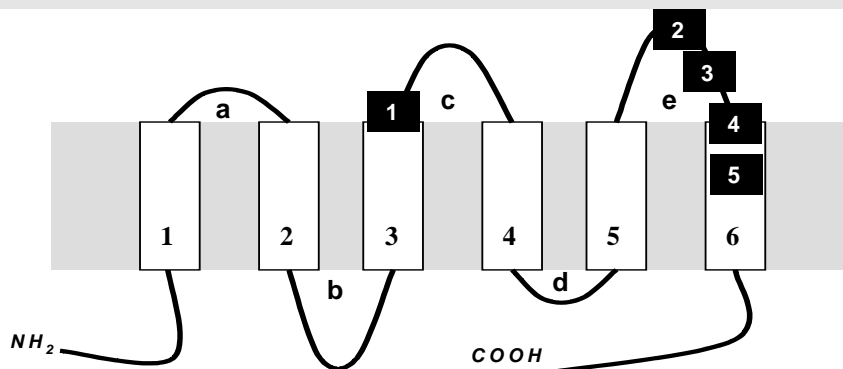
Les boucles C et D d'AQP2 seraient impliquées dans la formation du pore hydrique, d'après Bai et al., 1996.

Un travail équivalent réalisé avec les mutants d'AQP2 impliqués dans le diabète néphrogénique insipide a montré des résultats contraires puisque des substitutions de résidus dans les boucles B et E abolissent la fonction alors que des mutations dans les boucles C et E conduisent à un canal retenu dans le cytoplasme qui est cependant fonctionnel (Deen *et al.*, 1995; Deen *et al.*, 1994; Mulders *et al.*, 1997a; van Lieburg *et al.*, 1994).

Il est difficile de conclure quant aux parties de la protéine impliquées dans l'adressage ou dans la fonction d'AQP2 puisque les mêmes expériences réalisées par différentes équipes n'aboutissent pas aux mêmes résultats. D'autres résultats intéressants sont rapportés par les travaux effectués sur les mutants d'AQP2 impliqués dans le diabète néphrogénique insipide (annexe III).

Enfin, des travaux d'analyses de séquences, réalisés par le laboratoire de l'Université de Rennes, utilisant des outils statistiques ont mis en évidence 5 positions dans lesquelles les résidus étaient très spécifiques et conservés à l'intérieur d'une même sous-famille mais possédaient des propriétés physico-chimiques différentes entre chaque sous-famille (Froger *et al.*, 1998).

Figure II.17: Position des 5 résidus conservés parmi les membres d'un sous-groupe et différents d'un sous-groupe à l'autre



Quatre positions sur les cinq sont situées dans la boucle E et dans le sixième segment transmembranaire.

En général, la première cause attribuée à un défaut d'adressage de protéines mutées est leur repliement défectueux mais un défaut d'assemblage tétramérique correct n'avait jamais été mis en cause. Des ovocytes exprimant des AQP1 mutées sur des résidus situés près des motifs NPA ont une faible perméabilité sans doute parce que la plupart ne vont pas vers la membrane plasmique du fait d'une mauvaise oligomérisation (Mathai et Agre, 1999).

II.B.7. Etude de l'organisation membranaire

La structure tétramérique d'AQP1 pourrait être importante pour la fonction (bien que pour AQP1, chaque monomère est indépendamment fonctionnel) ou la stabilité. Rien ne nous dit si les aquaporines perméables aux solutés ont une structure équivalente à AQP1 puisque leurs fonctions diffèrent.

Si leurs structures sont identiques, il faut se demander si les solutés passent par le même pore que l'eau ou par un pore distinct, par exemple au centre du tétramère. Il se pourrait également que la structure soit différente.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'étude de l'oligomérisation des canaux hydriques de mammifères. Les observations ont eu lieu directement sur les membranes à l'aide de la microscopie électronique ou encore après cristallisation grâce à la diffraction aux rayons X. L'étude a également été réalisée à partir de protéines solubilisées grâce aux détergents non dénaturants par diverses approches biochimiques. Dans tous les cas étudiés, la protéine est soit présente nativement dans les membranes (globule rouge, cellules rénales...), ou bien elle y est présente artificiellement par expression hétérologue (levure, ovocyte) ou reconstitution (protéoliposomes...).

Etudes biochimiques

Mathai et Agre ont pu exprimer dans la levure des dimères contenant différentes combinaisons d'AQP1 sauvage et mutants non fonctionnels (A73M et C189M) dans le but de déterminer si une déstabilisation des domaines contenus dans les boucles B et E peuvent perturber les interactions entre sous-unités adjacentes. Ils ont ainsi démontré que les résidus alanine en position 73 et sérine en position 189 contribuent à l'assemblage du tétramère (Mathai et Agre, 1999). La structure d'AQP1 observée à 6Å de résolution (Walz *et al.*, 1997) montre que les points de contact entre sous-unités adjacentes sont contenus dans les hélices transmembranaires 1 et 3. Une mutation unique dans la boucle B peut donc conduire à la déstabilisation des domaines transmembranaires 2 et 3. Ainsi, la mutation peut provoquer une perturbation dans l'orientation de l'hélice 3 qui interagirait avec l'hélice transmembranaire 1 de la sous-unité voisine.

La formation tétramérique d'**AQP2** a été démontrée par les approches biochimiques (Kamsteeg *et al.*, 1999). Certaines des mutations d'AQP2 sont responsables du diabète néphrogénique insipide (annexe III). Dans la plupart des cas, ce sont des formes autosomiques récessives chez les hétérozygotes et ces mutations conduisent à un défaut d'adressage d'AQP2. Dans ce cas, les protéines mutées sont détruites et elles ne s'associent pas aux protéines sauvages pour former des hétérotétramères, les protéines sauvages ne sont donc pas retenues dans le cytosol et peuvent s'insérer dans la membrane apicale. L'explication d'une forme dominante, la mutation de l'acide glutamique en position 258 en lysine, est maintenant éclaircie. Elle est due à la rétention dans le cytosol d'hétérotétramères formés entre l'AQP2 sauvage et AQP2-E258K alors que les homotétramères ne sont pas formés (Kamsteeg *et al.*, 1999).

Deux formes d'**AQP4** ont été trouvées dans le cerveau, M1 et M23, codées par le même ARNm possédant deux sites d'initiation de la traduction. Des expériences de vitesse de sédimentation en gradients de saccharose et d'immunoprécipitation ont permis d'observer la formation d'hétérotétramères composés de ces deux isoformes (Neely *et al.*, 1999).

Il était communément admis que la structure tétramérique d'AQP1 était adoptée pour tous les autres canaux hydriques quelque soit leur sélectivité, même si on pensait que les aquaglycéroporines, du fait de leur différence de fonction et de séquence par rapport aux aquaporines, pouvaient adopter une structure quaternaire autre que tétramérique. L'équipe de Rennes a observé par des études biochimiques une structure monomérique pour GlpF et des changements fonctionnels (passage aquaporine à non fonctionnelle ou facilitateur de glycérol) et structuraux (passage tétramère à monomère) de certaines AQPcic mutées. La mutation S205D d'AQPcic induit la formation d'une protéine non fonctionnelle et monomérique. La double mutation Y222P/W203L (changement des acides aminés d'AQPcic par ceux de GlpF aux positions P4 et P5 situées dans le sixième passage transmembranaire, décrits précédemment,) fait perdre à AQPcic sa capacité à transporter l'eau mais lui fait acquérir la capacité à transporter le glycérol, de plus, la protéine mutée paraît monomérique (Lagree *et al.*, 1999; Lagree *et al.*, 1998a).

Des études biochimiques ont été menées sur **AQPZ** purifiée à partir de son système d'expression homologue *E. coli* (Borgnia *et al.*, 1999). La protéine, solubilisée par le dodécyl maltoside (DM) et soumise à un gradient de saccharose, existe sous une forme tétramérique. Ce tétramère est résistant à la trypsine et sa dissociation n'a pas lieu en présence de 1% de SDS à pH neutre. Des agents chaotropiques (Urée ou chlorure de guanidium à 8 M) ou des agents réducteurs hydrophiles (140 mM β -mercaptoéthanol ou 100 mM DTT) connus pour dissocier les sous-unités causent l'agrégation d'AQPZ. En revanche, une incubation dans 1% de SDS sans agent réducteur pendant 24 heures au moins, l'utilisation d'un tampon de charge à pH inférieur à 5,6 ou l'incubation avec l'agent réducteur hydrophobe éthanediol 60 mM, avant la migration sur gel SDS-PAGE cause une dissociation complète des tétramères. Deux cystéines sont présentes dans AQPZ (C9 et C20). Les mutants C9S et C20S sont toujours tétramériques sur gradient de saccharose. Par contre, après migration sur SDS-PAGE, la protéine mutée C20S devient monomérique alors que C9S demeure tétramérique comme l'AQPZ sauvage. Ces résultats pourraient suggérer que la cystéine en position 20 est importante pour l'association des sous-unités entre elles et qu'elle est située dans un environnement très hydrophobe.

La dissociation des tétramères par le pH acide et l'incubation longue en présence de 1% de SDS n'est cependant pas claire si un pont disulfure est en jeu.

L'étude de l'oligomérisation par la biochimie des protéines membranaires et la biologie moléculaire a permis une meilleure compréhension de la structure, de l'adressage et de la fonction des canaux hydriques. Elle ne peut cependant pas expliquer à elle seule la structure des protéines membranaires.

Etudes par cryofracture

L'organisation en réseaux orthogonaux de particules (OAPs, Orthogonal Arrays of Particles) avait été observée pour la première fois dans les hépatocytes par Kreutziger (Kreutziger, 1968).

Les OAPs ont été par la suite décrits dans certains tissus natifs comme dans les fibres musculaires squelettiques (Rash et Ellisman, 1974), dans la membrane basale des cellules du canal collecteur (Humbert *et al.*, 1975), dans les cellules fibreuses du cristallin (Zampighi *et al.*, 1982), dans les membranes d'astrocytes (Dermietzel, 1973), et bien d'autres (Wolburg, 1995). Certains de ces OAPs ont été attribués aux canaux hydriques, par exemple à AQP4 dans le muscle squelettique (Frigeri *et al.*, 1998) ou à AQP0 dans les cellules du cristallin (Zampighi *et al.*, 1989). La densité des OAPs dans les membranes d'astrocytes en culture est augmentée par l'élévation du taux d'AMPc intracellulaire induit par l'ajout de forskoline (Tao-Cheng *et al.*, 1992).

De plus, lorsqu'ils sont exprimés dans les systèmes hétérologues et/ou dans les protéoliposomes, certains canaux hydriques apparaissent sous forme d'OAPs. C'est le cas d'AQP0 dans les protéoliposomes (Ehring *et al.*, 1990), d'AQP4 dans les astrocytes (Rash *et al.*, 1998), d'AQP3 et d'AQP4 (Yang *et al.*, 1996) dans la lignée cellulaire CHO (cellules d'ovaires de Hamster Chinois), mais ce n'est pas le cas d'AQP1, d'AQP2 et d'AQP5 dans ces mêmes cellules (van Hoek *et al.*, 1998).

L'utilisation de la cryofracture rend possible la mesure du diamètre moyen des particules intramembranaires. Il a été observé que la face protoplasmique (P) de l'ovocyte de xénope présentait une faible densité de particules endogènes d'environ 200 particules/ μm^2 , alors que l'expression de protéines membranaires exogènes pouvait augmenter la densité de particules sur cette même face jusqu'à 5000 particules/ μm^2 (Zampighi *et al.*, 1995).

Le tableau suivant récapitule les observations faites pour quelques canaux hydriques après expression dans divers systèmes. La quantité d'ARN injecté dans les ovocytes est précisée en ng dans certains cas, ainsi que le nombre de jours attendus après injection pour préparer les membranes d'ovocytes (J).

Tableau II.1: Analyse en cryofracture de particules intramembranaires

Membranes	Méthode ombrage	Diamètre observé des particules (nm)	Epaisseur de platine (nm)	Diamètre réel des particules (nm)	Densité membranaire (particules/ μm^2)	OAPs
Ovocyte Zampighi <i>et al.</i> , 1995	80°	7,2 ± 0,5	?	?	212 ± 48	non
Ovocyte Eskandari <i>et al.</i> , 1998	80°	7,6 ± 0,5 (93%) 11,1 ± 1,0 (7%)	1,2 x 2	5,2 ± 0,5 8,7 ± 0,5	355 ± 21	non
Ovocyte-AQP0 (150ng) Zampighi <i>et al.</i> , 1995	80°	8,0 ± 0,6	?	?	334 ± 77 (J1) 1085 ± 112 (J2) 4109 ± 684 (J3)	non
Ovocyte AQP0 (?) Eskandari <i>et al.</i> , 1998	80°	9,0 ± 0,3	1,2 x 2	6,6 ± 0,5	3288 ± 136	non
Ovocyte AQP1 (4ng) Zampighi <i>et al.</i> , 1995	80°	9,3 ± 0,4	?	?	450 ± 83 (J3)	non
Ovocyte AQP1 (?) Eskandari <i>et al.</i> , 1998	80°	7,3 ± 0,6 (45%) 8,9 ± 0,2 (55%)	1,2 x 2	6,5 ± 0,5	825 ± 63	non
CHO Verbavatz <i>et al.</i> , 1993	45°	7,3 ± 2,0	1,5	5,8 ± 2,0	1282 ± 110	non
CHO Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	5,5 ± 2,8	1258 ± 313	non
	rotatif	9,6 ± 1,7 13,1 ± 1,5	2	7,6 ± 1,7 11,1 ± 1,5		
CHO AQP1 Verbavatz <i>et al.</i> , 1993	45°	8,8 ± 1,9	1,5	7,3 ± 1,9	3682 ± 436	non
CHO AQP1 Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	6,9 ± 2,0	2428 ± 185	non
	rotatif	8,9 ± 1,7	2	6,9 ± 1,7		
CHO AQP2 Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	6,8 ± 2,0	1504 ± 150	non
	rotatif	7,5 ± 1,6	2	5,5 ± 1,6		
CHO AQP3 Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	4,3 ± 0,9 7,5 ± 2,0	1580 ± 211	oui
	rotatif	8,9 ± 1,8	2	6,9 ± 1,8		
CHO AQP4 Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	3,9 ± 1,3 7,6 ± 1,6	1791 ± 258	oui
	rotatif	7,0 ± 0,9	2	5,0 ± 0,9		
CHO AQP5 Van Hoek <i>et al.</i> , 1998	45°		1,5	4,1 ± 0,7 7,3 ± 1,7	1575 ± 146	non
	rotatif	8,8 ± 2,1	2	6,8 ± 2,1		
Protéoliposomes AQP1 Verbavatz <i>et al.</i> , 1993	45°	8,5 ± 1,3	1,5	7 ± 1,3	variable	non

Le tableau récapitulatif montre des variations suivant les méthodes et les systèmes d'expression utilisés pour une même protéine. Nous voyons qu'il est difficile de déterminer le nombre précis de sous-unités des canaux hydriques puisqu'une variation d'un nanomètre est souvent rencontrée et que la différence de diamètre d'une particule à une unité ou à 4 unités varie dans ce même ordre de grandeur.

Les études de biochimie aussi bien que celles en microscopie électronique montrent qu'il est difficile d'identifier l'assemblage oligomérique des protéines de la famille MIP au sein des membranes. La détermination de la structure en trois dimensions de ces protéines est un moyen de répondre à cette question. Cependant, la cristallisation des protéines ne reflète pas non plus l'organisation naturelle de ces protéines puisqu'elle impose le regroupement des monomères l'un contre l'autre.

Approches cristallographiques

La carte de projection de cristaux d'AQP0 obtenue à 9Å de résolution montre une organisation tétramérique similaire à celle d'AQP1 (Hasler *et al.*, 1998).

Des cristaux d'AQPcic ont aussi été obtenus et la carte de projection à 24Å de résolution indique également une structure tétramérique (Beuron *et al.*, 1995).

La production d'AQPZ portant une série de 10 histidines en N-terminal a été effectuée (Borgnia *et al.*, 1999). Des cristaux à deux dimensions d'AQPZ ont été obtenus. Un arrangement similaire aux cristaux d'AQP1 est observé en microscopie électronique sur la carte en 3 dimensions reconstituée après coloration négative de la préparation ainsi que sur la carte de projection à 8Å de résolution obtenue sur des cristaux inclus dans le tréhalose (Ringler *et al.*, 1999). Le relief des surfaces extramembranaires a été visualisé grâce à l'AFM. Cette méthode a permis de détecter la localisation de la séquence N-terminale cytoplasmique après protéolyse des histidines, ainsi que la localisation de certaines boucles en variant la force atomique appliquée à l'échantillon (Scheuring *et al.*, 1999).

II.C. AQP3, LA PREMIERE AQUAGLYCEROPORINE DONT LA STRUCTURE RESTE INCONNUE.

Par diverses approches, aucun consensus n'a été obtenu concernant la voie de passage de ces molécules entre les divers groupes. Certains sont en faveur d'une voie de passage commune pour l'eau et les petits solutés puisque HgCl_2 et la phlorétine inhibent aussi bien le passage d'eau que le passage de glycérol à travers AQP3 exprimée dans l'ovocyte de xénope (Ishibashi *et al.*, 1994). Par contre, D'autres ont observé une inhibition de la P_f par le pCMBS, par HgCl_2 et par la phlorétine mais aucune inhibition n'est observée sur la P_{gly} ; ils seraient favorables à deux passages distincts pour l'eau et le glycérol. Cette équipe a également noté une inhibition par le pCMBS de la P_{gly} des ovocytes, et a suggéré la présence d'un transporteur endogène de glycérol dans l'ovocyte de xénope (Echevarria *et al.*, 1996), déjà décrit par Maurel *et al.*; (Maurel *et al.*, 1994). Les travaux de Zeuthen *et al.*, décrits précédemment (chapitre II.B.2), sont en faveur d'un passage commun entre l'eau et le glycérol, et un effet du pH est observé sur P_f et P_{gly} d'ovocytes exprimant AQP3 (Zeuthen et Klaerke, 1999).

L'AQP3 comme les autres canaux hydriques possède une perméabilité hydrique réduite sous l'effet d'un traitement au mercure. Dans le but de déterminer les résidus impliqués dans cette sensibilité et d'élucider la structure du pore, Kuwahara a testé la fonction de mutants d'AQP3 humaine dans lesquels les 6 cystéines ont été remplacées individuellement. Seule la mutation de la cystéine 11 rend cette protéine insensible au mercure. De plus, la double mutation C11S/Y212C correspondant à la position des résidus sensibles au mercure dans AQP1 (C189) et AQP2 (C181) la rend sensible au mercure (Kuwahara *et al.*, 1997). Cependant, les mêmes auteurs avaient montré que la cystéine sensible était la cystéine en position 91 de l'AQP3 de rat, et l'inhibition par le mercure n'était pas observée sur l'AQP3 humaine (Kuwahara *et al.*, 1996).

PARTIE II

PRESENTATION DES TRAVAUX

OBJECTIF DES ETUDES PRESENTEES DANS LES CHAPITRES SUIVANTS

La perméabilité élevée du globule rouge est liée à la présence d'AQP1 mais aucune protéine connue n'a été associée à la perméabilité au glycérol non négligeable de ce tissu qui ne peut être due à la simple diffusion à travers la bicouche lipidique. Nous avons voulu savoir dans un premier temps si AQP3 ne pouvait pas être responsable du transport facilité de glycérol à travers la membrane des érythrocytes.

AQP3 est le premier canal hydrique qui ne possédait pas de sélectivité stricte à l'eau et permettait également le passage d'urée et de glycérol (Echevarria *et al.*, 1994; Ishibashi *et al.*, 1994). L'analyse de la séquence d'AQP3 a montré qu'elle était plus proche des facilitateurs de glycérol, GlpF et Fps1, que des aquaporines strictes. Cette protéine a attiré notre attention puisque son étude permettrait de comprendre la sélectivité variable des protéines MIP. La localisation des voies de passage pour l'eau et le glycérol dans les aquaglycéroporines pourrait être déterminée par la comparaison des structures en trois dimensions. L'obtention de cristaux purs en vue de ces études est le premier problème à résoudre. Elle nécessite la purification de la protéine en grande quantité, de l'ordre du milligramme. Les canaux hydriques, excepté AQP1 que l'on peut purifier aisément à partir du globule rouge humain, doivent être surexprimés dans les systèmes d'expression hétérologue. Les travaux de Laizé *et al.* ont montré pour la première fois que la levure était un outil d'expression hétérologue capable de produire l'AQP1 humaine (Laizé *et al.*, 1995). Nous avons également observé une expression de l'AQP3 de rat dans ce système (voir chapitre suivant) et la purification de l'AQP3 humaine est en cours au laboratoire, c'est le travail de Bénédicte Oriou.

Le problème de la sélectivité peut aussi être abordé par des approches de biologie moléculaire et de biochimie. L'analyse comparative des séquences d'aquaporines et d'aquaglycéroporines (voir Introduction) montre des différences de longueur et de composition en acides aminés dans certaines parties et notamment dans la boucle E en aval du motif NPA. Nous avons donc choisi dans un premier temps de construire des chimères entre une aquaporine, AQP2, et une aquaglycéroporine, AQP3, et d'analyser leur fonction.

La deuxième étude porte sur la détermination de l'oligomérisation d'AQP3. L'équipe de Rennes a en effet mis en cause l'implication de l'état d'oligomérisation des protéines MIPs dans leur sélectivité (Lagree *et al.*, 1999; Lagree *et al.*, 1998a). Le facilitateur de glycérol GlpF semble être monomérique alors que l'aquaporine AQPcic apparaît tétramérique. Il nous a donc paru intéressant de connaître l'état d'oligomérisation d'une aquaglycéroporine qui est capable de transporter aussi bien l'eau que le glycérol. Nous avons entrepris cette étude par le calcul du coefficient de sédimentation d'AQP3 après sa solubilisation en conditions non dénaturantes, et par l'observation en cryofracture de membranes exprimant AQP3.

CHAPITRE III. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'AQP3 DANS LES GLOBULES ROUGES HUMAINS

III.A. INTRODUCTION

Le premier canal hydrique, AQP1, a été découvert dans le globule rouge humain. C'est grâce à cette protéine que la perméabilité hydrique de ces cellules est très élevée. Cependant, le globule rouge humain possède également une perméabilité au glycérol supérieure à celle de globules rouges d'autres espèces comme ceux de bovins (Mazur *et al.*, 1974). Cette perméabilité ne peut pas s'expliquer par le passage du glycérol par simple diffusion. Il doit être facilité par une protéine membranaire. AQP1 étant très sélective pour l'eau, elle ne pouvait rendre compte de la perméabilité au glycérol observée. Cependant, Abrami *et al.* avaient montré que l'expression d'AQP1 dans les ovocytes de xénope augmentait leur perméabilité au glycérol. Afin de s'affranchir d'un éventuel passage de glycérol à travers AQP1, nous avons choisi d'utiliser des globules rouges dépourvus d'AQP1 pour nos expériences. Ces cellules dites de phénotype Colton négatif (voir Annexe IV) possèdent une perméabilité hydrique plus faible que les globules rouges normaux mais la valeur de cette perméabilité et sa partielle inhibition par les dérivés mercuriels amènent à penser que l'eau passe par un système facilité dont serait responsable une ou plusieurs autre(s) protéine(s). Les transporteurs de glycérol connus actuellement sont peu nombreux: GlpF chez la bactérie, Fps1 chez la levure et chez certains mammifères, AQP3, AQP7 et AQP9. AQP3 a été détectée dans divers tissus comme le rein, l'intestin, l'estomac, le poumon, la rate, l'oeil... alors qu'AQP7 n'a été trouvée que

dans le testicule. AQP3 semblerait être le bon candidat pour le transport de glycérol du globule rouge humain, à défaut d'AQP1.

III.B. MATERIELS ET METHODES

III.B.1. Mesure de P_f et transport de glycérol par spectrophotométrie à flux interrompu

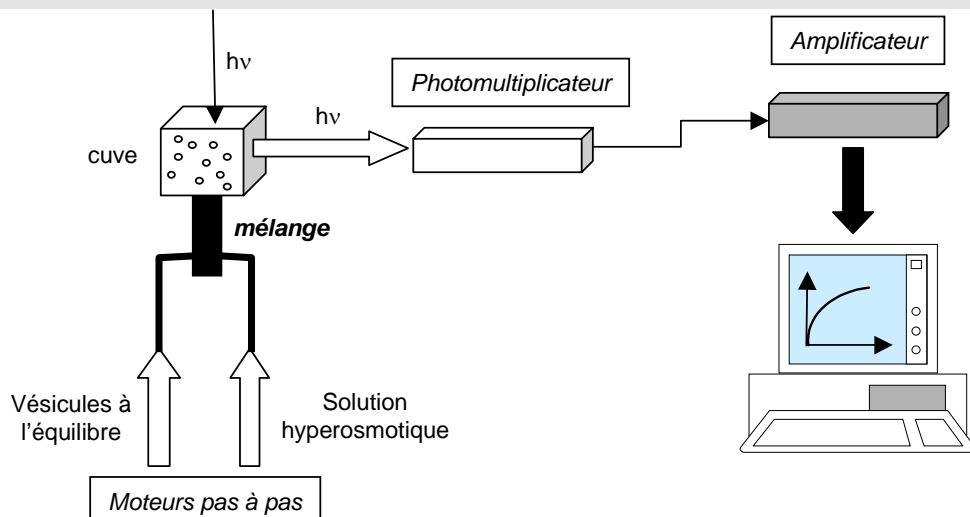
III.B.1.a Préparation des globules rouges

Les globules rouges congelés normaux et de phénotype Colton (Co (a \bar{b})) nous ont été fournis par l'Institut National de Transfusion Sanguine de Paris. Une fois décongelés, ils sont lavés dans un tampon Carlsen (154 mM NaCl, 5 mM D-glucose, 0,25 mM KH₂PO₄, 0,25 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) d'osmolarité finale 300 mOsm/L (Carlsen et Wieth, 1976). Les cellules sont ensuite resuspendues dans ce même tampon à 10⁷ cellules/ml.

III.B.1.b Principe du spectrophotomètre à flux interrompu

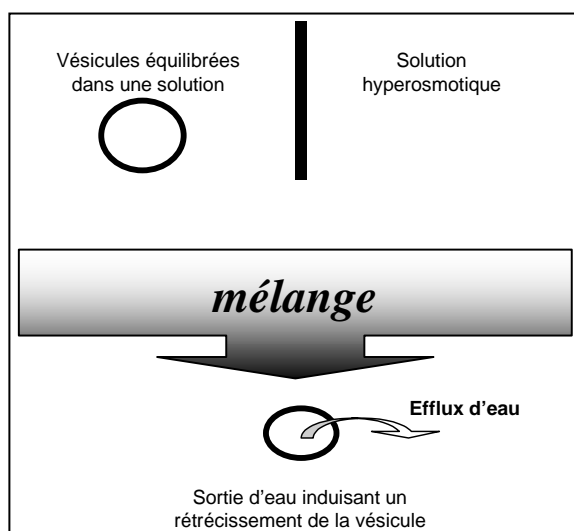
Les mesures de perméabilité sont effectuées grâce à un spectrophotomètre à flux interrompu SFM3 de chez Biologic. L'avantage du spectrophotomètre à flux interrompu est de pouvoir mesurer des constantes de vitesse très élevées sur des petits échantillons qui doivent être purs et homogènes. Cette technique a été développée initialement sur les vésicules membranaires (Kasai *et al.*, 1979), puis sur les érythrocytes (Mlekoday *et al.*, 1983) et fut appliquée par la suite sur des cellules en suspension (Chen et Verkman, 1987; Pratz *et al.*, 1986) et des protéoliposomes (Van Hoek et Verkman, 1992).

Figure III.1: Schéma du spectrophotomètre à flux interrompu



Les érythrocytes ($10^7/\text{ml}$) dont on veut mesurer la perméabilité membranaire sont placés dans une cuve d'observation de $15\ \mu\text{l}$. Une fibre optique amène une lumière monochromatique provenant d'une lampe à arc mercure-xénon de 150 W sur la cuve contenant les cellules. Celles-ci émettent à leur tour une lumière dans tous les sens. On mesure l'intensité lumineuse diffusée à 90° par les cellules. L'intensité lumineuse est ensuite convertie en intensité électrique par un photomultiplicateur puis est amplifiée par un amplificateur. Le signal est visualisé sur un écran d'ordinateur et analysé grâce à un logiciel.

Figure III.2: Utilisation du spectrophotomètre en diffusion de la lumière



La suspension de vésicules est équilibrée dans un tampon. Afin de provoquer un mouvement d'eau à travers la membrane, les vésicules sont rapidement mélangées à une solution hyperosmotique. Un flux d'eau sortant a lieu, induisant une réduction de volume des vésicules ainsi qu'une augmentation de l'intensité lumineuse. La vitesse de variation de l'intensité lumineuse diffusée permet une mesure instantanée de la vitesse de variation de volume de la vésicule.

La méthode peut aussi être appliquée pour visualiser un transport de soluté mais les phénomènes liés à la présence d'un transport d'eau concomitant ainsi que des changements d'indice de réfraction dépendant du temps ne permettent pas d'analyser les courbes obtenues pour un calcul précis de perméabilité aux solutés. Pour parer à ces difficultés, il est possible de mesurer des perméabilités grâce à la fluorescence. Dans ce cas, les vésicules sont chargées en fluorophore. Lorsqu'elles sont soumises à un gradient osmotique entrant, l'efflux d'eau induit provoque une augmentation de la concentration intravésiculaire du fluorophore causant un "quenching" et une diminution de l'intensité de fluorescence.

III.B.1.c Calcul de P_f

Les variations de volume des globules rouges en fonction du temps vont permettre de calculer le coefficient de perméabilité hydrique osmotique après avoir moyenné plusieurs cinétiques. La constante de vitesse initiale de la cinétique, k en s^{-1} , est obtenue grâce au logiciel Biokine (Biologic). La perméabilité hydrique est déterminée à partir de la constante de vitesse de l'intensité observée, du rapport surface sur volume des vésicules et de la relation entre l'intensité et le volume vésiculaire en fonction du temps. Cette dernière relation est déterminée à partir des mesures de variation de l'intensité effectuées pour des séries de gradients osmotiques différents (Chen *et al.*, 1988). Le coefficient P_f est obtenu par l'équation:

$$\frac{dV(t)}{dt} = Pf \times \frac{S}{V_0} \times V_w \times \left[\left(\frac{C_{int}}{V(t)} \right) - C_{ext} \right]$$

où $V(t)$ est le volume relatif des hématies en fonction du temps, S/V_0 est le rapport surface sur volume initial d'une hématie (13500 cm^{-1}) (Jay, 1975), V_w est le volume molaire partiel de l'eau équivalent à $18 \text{ cm}^3/\text{mol}$, C_{int} et C_{ext} sont les concentrations initiales du soluté à l'intérieur et à l'extérieur des hématies.

Des cinétiques théoriques simulées à partir de l'équation précédente pour des valeurs arbitraires de P_f sont utilisées pour obtenir les valeurs de constantes de vitesse de l'exponentielle k . Une courbe de calibration de P_f en fonction de k est ainsi obtenue et utilisée pour déterminer P_f pour les constantes k expérimentales.

III.B.1.d Calcul de la constante de vitesse d'entrée de glycérol

Les globules rouges (10^7 / ml) équilibrés dans le tampon Carlsen, sont mélangés à une solution hyperosmotique de glycérol 100 mM. Deux phénomènes se produisent simultanément: une sortie d'eau rapide due à une différence de gradient osmotique et une entrée de glycérol plus lente. Ceci se traduit par un rétrécissement rapide du globule rouge suivi par son regonflement, ce qui se visualise par une cinétique biphasique. Le spectrophotomètre ne s'utilise en principe que pour des phénomènes rapides, la perméabilité d'un soluté étant un phénomène relativement lent, sa valeur ne peut être qu'estimée. Nous ne donnerons donc que la valeur k en s^{-1} calculée sur la cinétique d'entrée de glycérol.

III.B.1.e Inhibition des flux d'eau et de glycérol

Pour l'inhibition du transport hydrique, l'expérience est identique à celle décrite plus haut mais en présence d'une solution hyperosmotique de saccharose à l'extérieur. Pour le transport de glycérol, afin de s'affranchir du flux d'eau sortant, les mesures sont effectuées en condition isoosmotique. Les hématies sont équilibrées dans le tampon comportant 200 mM de glycérol. Le tampon additionné de 200 mM de saccharose est présent dans l'autre seringue. Un gradient de glycérol sortant de 100 mM est ainsi créé.

Dans les deux cas, les globules rouges sont préincubés 10 minutes à température ambiante en présence de 0,1 mM de sulfate de cuivre (CuSO_4), 0,1 ou 0,5 mM de phlorétine ou 0,2 mM de DIDS, ou bien 5 minutes avec 0,5 mM de chlorure de mercure (HgCl_2).

III.B.2. Mesure de la perméabilité au glycérol des globules rouges

III.B.2.a Préparation des fantômes d'hématies

Les globules rouges lavés dans le tampon Carlsen, sont lysés dans un tampon hypotonique: 5 mM Na_2HPO_4 , pH 8,0, contenant 20 $\mu\text{g/ml}$ de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et 2 μg de pepstatine. Ils sont centrifugés pendant 20 minutes à 25000g, 4°C. Les membranes sont resuspendues dans 5 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 100 mM glycérol, pH 8,00 à 10^8 fantômes d'hématies/ml. La vésiculation a lieu à 37°C pendant 1 heure.

III.B.2.b Transport de ^{14}C -glycérol par filtration ultra-rapide et mesure de P_{gly}

La cinétique d'efflux de glycérol est effectuée par un appareil de filtration ultra-rapide. Les fantômes d'hématies sont incubés pendant 1 heure avec du glycérol- ^{14}C à 5 $\mu\text{Ci/ml}$ et du mannitol- ^3H en même quantité. 6×10^7 fantômes sont déposés sur un filtre et rincés pendant des périodes allant de 500 ms à 10 s à un débit de 1 ml/s. La solution de rinçage contient 100 mM de raffinose à la place du glycérol pour rester dans des conditions iso-osmotiques. Le mannitol étant imperméant, il rend compte de la quantité de vésicules restées sur le filtre. Le rapport glycérol ^{14}C /mannitol ^3H est reporté en fonction du temps de rinçage et représente la quantité de glycérol restée dans les fantômes d'hématies après un temps t.

La cinétique donne la constante de vitesse k en s^{-1} que l'on utilisera pour calculer la perméabilité au glycérol P_{gly} (cm/s):

$$P_{gly} = \frac{k}{S/V_0}$$

avec S/V_0 le rapport surface sur volume initial d'un fantôme d'hématie.

III.B.3. Détection immunologique d'AQP3

III.B.3.a Production et purification de l'anticorps anti-AQP3

Synthèse du peptide synthétique

Le peptide contre lequel nous avons fabriqué les anticorps polyclonaux correspond aux 26 derniers acides aminés de la séquence C-terminale de l'aquaporine 3 de rat. Cette séquence ne diffère que de trois acides aminés dans l'AQP3 humaine. Les anticorps vont donc pouvoir éventuellement être utilisés aussi bien chez l'Homme que chez le Rat. Les probabilités d'une reconnaissance de la protéine humaine par les IgG préparées contre la protéine murine sont donc grandes.

- C-terminal AQP3 humain (267 à 292):

C-H-L-E-Q-P-P-P-S-T-E-A-E-N-V-K-L-A-H-M-K-H-K-E-Q-I

- C-terminal AQP3 de rat (254 à 279):

C-H-L-E-Q-P-P-P-S-N-E-E-E-N-V-K-L-A-H-V-K-H-K-E-Q-I

Le peptide a été synthétisé chez NEOSYSTEM (Strasbourg). Il a été couplé par la cystéine en position NH_2 terminale à une protéine vectrice: l'ovalbumine.

Production des anticorps

La production des anticorps polyclonaux a été effectuée chez le lapin par NEOSYSTEM. Avant l'immunisation, un sérum pré-immun est prélevé et servira de témoin négatif. L'antigène est injecté en sous-cutanée après une première immunisation, des rappels à trois ou quatre semaines d'intervalle sont réalisés. Les rappels sont effectués jusqu'à l'obtention d'un résultat positif du sérum testé en immunotransfert sur des protéines totales provenant de la médullaire externe de rein de rat.

Purification des anticorps par affinité

Les anticorps spécifiquement dirigés contre la séquence C-terminale d'AQP3 de rat sont purifiés à l'aide du kit SulfoLink#2 (Pierce).

Préparation de la colonne.

La colonne de gel filtration comportant 6% de billes d'agarose (type de fixation du peptide) est équilibrée avec le tampon de couplage (50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8,5). 1 mg de peptide est mélangé avec le gel pendant 15 minutes à température ambiante. La colonne est laissée au repos pendant 30 minutes puis lavée avec le tampon de couplage. Pour bloquer les sites non spécifiques, le tampon de couplage contenant 0,05 M de cystéine est ajouté et la résine est agitée pendant 15 minutes à température ambiante puis laissée au repos pendant 30 minutes. La colonne est ensuite lavée avec 1 M de NaCl et un disque poreux est inséré sur le haut du gel. La colonne est conservée dans du PBS avec 0,05% d'azide de sodium (NaN_3) à 4°C.

Purification des anticorps anti-peptide AQP3.

La colonne est lavée avec du PBS. 1 ml de sérum et 1 ml de PBS sont ajoutés à la colonne. Le tout est mélangé pendant 1 heure à température ambiante. Cette étape permet la fixation des anticorps spécifiques sur le peptide. Un lavage au PBS élimine les anticorps non spécifiques. Les anticorps sont ensuite élués et des fractions sont collectées dans des tubes contenant du Tris 1 M à pH 9,5. Les fractions dont la DO à 280 nm est la plus élevée sont réunies. La concentration de l'anticorps purifié anti-AQP3 est de 0,13 µg/µl.

III.B.3.b Immunotransfert ou western blot

Les protéines provenant de médullaire externe de rein de rat, de fantômes d'hématies humaines ou de rat ainsi que de l'AQP1 humaine purifiée à partir des globules rouges sont déposées sur un gel de polyacrylamide à 12,5% après leur dénaturation à 65°C pendant 10 minutes. Elles sont séparées en présence de SDS (Laemmli, 1970) puis transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, NEN-Du Pont de Nemours). La membrane est saturée pendant 1 heure par 5% de lait en poudre contenu dans un tampon phosphate salin (PBS), PBS/lait. Après rinçage de la membrane, les anticorps polyclonaux (anti-AQP3 purifiés dilués au 1/500^{ème} (0,25 µg/ml) ou le sérum anti-AQP1 au 1/500^{ème}) sont incubés dans du PBS/lait contenant 0,2% de Tween 20 (PBS/lait/Tween) pendant 1 heure. Un contrôle négatif est réalisé en incubant préalablement l'anticorps anti-AQP3 pendant 10 minutes avec le peptide d'immunisation à 0,2 mg/ml avant de le mettre en contact avec la membrane. La membrane est rincée dans le PBS/lait/Tween et incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (1/5000) pendant 1 heure en PBS/lait/Tween. La membrane est à nouveau rincée en PBS/Tween puis en PBS et révélée par chimioluminescence (technique ECL, Enhanced ChemiLuminescence, Amersham).

III.B.3.c Immunofluorescence indirecte

Les hématies sont lavées dans du tampon PBS, fixées pendant 1 heure à température ambiante dans le PBS contenant 4% de paraformaldéhyde et lavées dans le PBS. Le culot de cellules est récupéré après centrifugation à 2000g pendant 3 minutes et resuspendu dans du PBS contenant 2,3 M de saccharose.

L'échantillon est ensuite congelé dans l'azote liquide et des coupes de 0,75 μm sont effectuées à -70°C à l'aide d'un ultramicrotome (Reichter, Leica). Des reins de rats sont fixés avec une solution contenant 7,1 mM Na_2HPO_4 , 30,4 mM NaH_2PO_4 , 75 mM lysine, 10 mM periodate de sodium et 2% de paraformaldéhyde (pH 7,4). Ils sont lavés au PBS et mis une nuit dans du PBS contenant 30% de saccharose avant d'être congelés dans l'azote liquide. Des coupes de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica) et les coupes sont déposées sur lames. Celles-ci sont incubées pendant 5 minutes dans du PBS contenant 1% de sérum albumine bovin (PBS/BSA), puis 1 heure avec le premier anticorps (sérum anti-AQP3 dilué 300 fois, avec ou sans préincubation avec le peptide d'immunisation, ou sérum anti-AQP1 dilué 100 fois) en PBS/BSA. Les coupes sont lavées 3 fois 10 minutes en PBS, incubées 45 minutes avec le second anticorps anti-lapin fabriqué chez la souris et couplé au CY3 (6 $\mu\text{g/ml}$) puis lavées 2 fois 10 minutes dans le PBS. Les préparations sont observées au microscope à fluorescence (Olympus Vanox-T).

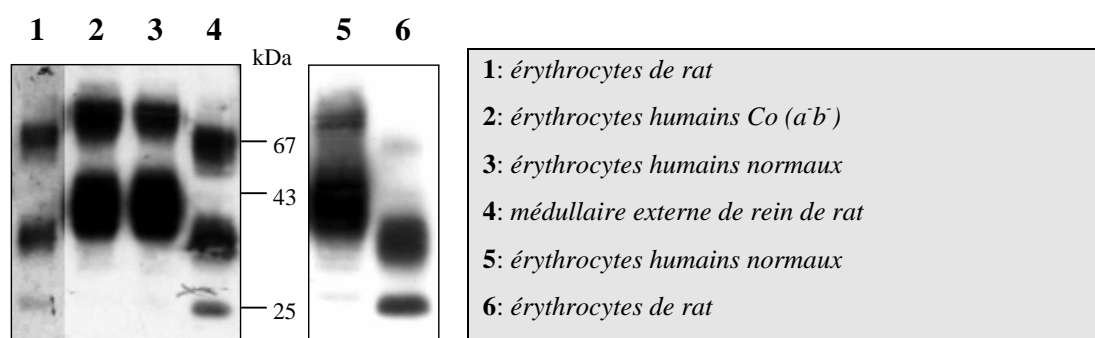
III.C. RESULTATS

III.C.1. Analyse de la présence d'AQP3 par les méthodes immunologiques

III.C.1.a Immunotransfert

La figure ci-dessous représente les protéines provenant de médullaire externe de rein de rat, de globules rouges de rat et de globules rouges humains de phénotype normaux et Co (a^b) marquées avec l'anticorps anti-AQP3 purifié.

Figure III.3: Immunotransfert utilisant l'anticorps anti-AQP3



La colonne 4 montre le profil caractéristique du marquage des protéines de la médullaire externe de rein de rat obtenu avec un tel anticorps (Ecelbarger *et al.*, 1995); c'est à dire une bande vers 25 kDa, une bande s'étalant de 33 à 40 kDa et une dernière bande vers 68 kDa. Un profil équivalent est observé sur les protéines des membranes de globule rouge de rat en colonne 1. Ceci suggère que l'aquaporine-3 est présente aussi bien dans les membranes d'hématies que dans celles des cellules de la médullaire externe du rein chez le rat.

Les colonnes 2 et 3 montrent le résultat obtenu sur les membranes d'hématies humaines Colton négatif et normales, respectivement. L'anticorps dirigé contre le peptide C-terminal d'AQP3 de rat reconnaît des protéines dans les membranes des globules rouges humains des deux types. Deux fortes bandes sont observées à environ 37-48 kDa et 70 kDa. Une autre bande à 25 kDa est visible mais beaucoup moins intense que celle observée chez le rat, à quantité de protéines totales équivalentes. Par contre, les protéines de hauts poids moléculaires montrent un signal nettement plus intense et leurs tailles sont plus élevées que chez le rat. Lorsque l'anticorps est préalablement incubé avec le peptide, aucun signal n'est visible sur les protéines de médullaire externe de rein de rat, de membranes de globules rouges de rat et d'humain (non montré).

Des différences sont observées entre les globules rouges de rat et d'humain tant au niveau des tailles des protéines de haut poids moléculaires que de leur intensité. La forme monomérique non glycosylée de la protéine dans le globule rouge humain est très faiblement représentée par rapport aux formes migrant moins loin. Les deux bandes supérieures pourraient correspondre à des formes différentes glycosylées du monomère et/ou à des formes oligomérisées, glycosylées ou non, si l'on considère que la dénaturation n'a pas été totale. Dans les deux cas, ces bandes sont plus élevées dans les membranes d'hématies humaines que dans celles de rat, elles sont aussi en quantité plus importante.

Il est à noter qu'un autre immunoblot a été réalisé dans les mêmes conditions mais celui-ci n'a pas révélé les bandes de haut poids moléculaire aussi bien dans les globules rouges humains (colonne 5) que dans ceux de rat (colonne 6). Chez le rat, la forme monomérique non glycosylée est plus importante et la bande de haut poids moléculaire a pratiquement disparu dans la colonne 6 par rapport à la colonne 1. Ceci suggère que cette forme lourde correspondrait à une forme oligomérisée d'AQP3 plutôt qu'à une forme glycosylée.

Le fait qu'un même signal soit obtenu avec les membranes d'hématies humaines Colton et normales permet d'exclure une reconnaissance d'AQP1 par les IgG anti-AQP3. En effet, les protéines des globules rouges humains normaux et Colton ont été également révélées par un sérum contenant des anticorps dirigés contre la protéine AQP1 pure.

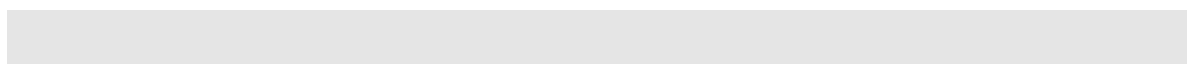
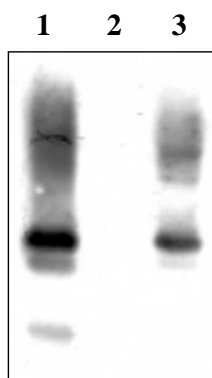


Figure III.4: Immunotransfert utilisant l'anticorps anti-AQP1



1: AQP1 purifiée,
2: érythrocytes humains Co (a⁻b⁻),
3: érythrocytes humains normaux

L'anticorps reconnaît bien la protéine AQP1 purifiée en colonne 1 ainsi qu'une protéine dans les membranes d'érythrocytes humains normaux en colonne 3. Par contre, dans les membranes d'érythrocytes Colton en colonne 2, aucun signal n'est observé. Ceci confirme qu'AQP1 est bien absente des globules rouges Colton et que la protéine reconnue en colonne 2 de la figure III.3 n'est pas AQP1.

D'autre part, en colonne 2, l'anti-AQP1 ne reconnaît pas non plus ce qui est reconnu dans les globules rouges Colton. Il n'y a donc pas de réaction croisée entre ces deux anticorps et ces deux protéines.

III.C.1.b Immunofluorescence indirecte

Sur des coupes de globules rouges humains de 0,75 µm, le sérum total anti-AQP3 marque les membranes d'hématies normales (a) mais aussi celles d'hématies de phénotype Colton (c et d). Si l'anticorps a préalablement été épuisé par le peptide, aucun marquage n'est observé (b, globules rouges normaux). Par contre, le sérum anti-AQP1 reconnaît seulement les membranes des globules rouges normaux (e; normaux, f; Colton).

L'anti-AQP3 a également été utilisé sur des coupes de néphrons de rein de rat de 5 μm . Un marquage est visualisé sur les membranes plasmiques basolatérales des cellules principales du canal collecteur où est habituellement localisé l'AQP3, et non sur les cellules intercalaires. On observe aussi un marquage sur les globules rouges présents dans ce même tissu. Ces résultats montrent donc que l'aquaporine-3 est présente aussi bien dans les membranes des érythrocytes humains que dans celles des érythrocytes de rat.

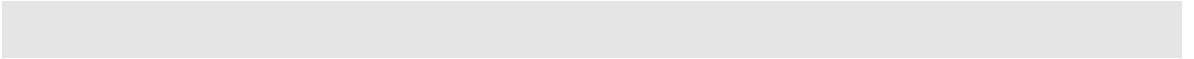
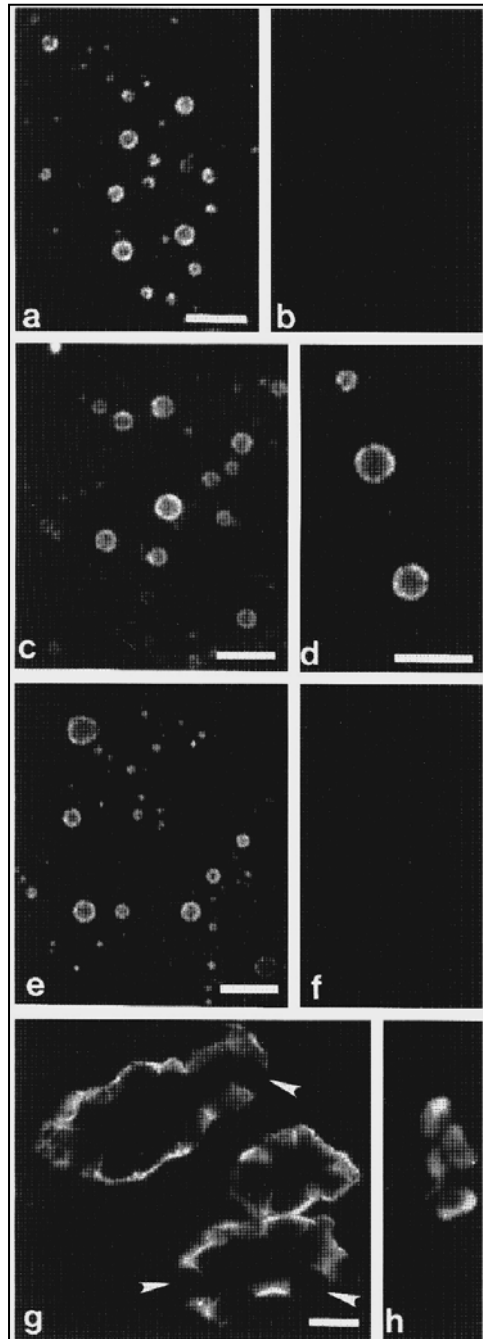


Figure III.5: *Immunofluorescence indirecte réalisée sur les globules rouges humains et le rein de rat*



L'anticorps anti-AQP3 marque les globules rouges humains normaux (a) et Colton (c et d, à deux échelles différentes) et aucun marquage n'est observé si l'anticorps anti-AQP3 est préabsorbé avec le peptide (b, globules rouges normaux).

L'anticorps anti-AQP1 marque les globules rouges normaux (e) mais il ne marque pas les globules rouges Colton (f).

Les coupes de 5 μm montrent que la membrane plasmique des cellules du canal collecteur (g) et les globules rouges de rat (h) sont marqués avec l'anticorps anti-AQP3.

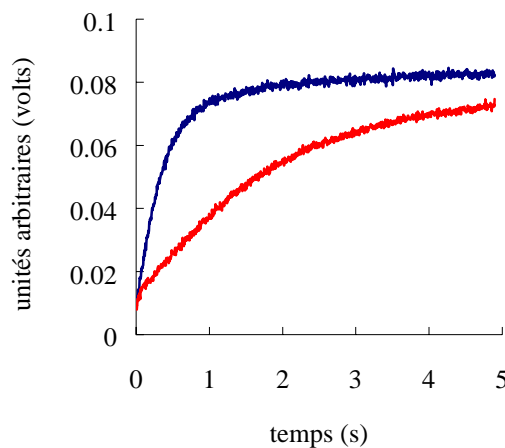
Barres (a-f) = 5 μm et (g et h) = 15 μm

III.C.2. Mesure des perméabilités à l'eau et au glycérol

III.C.2.a Perméabilité à l'eau par spectrophotomètre à flux interrompu

La perméabilité hydrique des globules rouges Colton a tout d'abord été comparée à celle des globules rouges normaux à 26°C.

Figure III.6: Cinétiques typiques d'efflux d'eau obtenues après un choc hyperosmotique de 100mM de saccharose



La cinétique d'efflux d'eau pour les globules rouges normaux est représentée en bleu, celle des globules rouges Colton est en rouge.

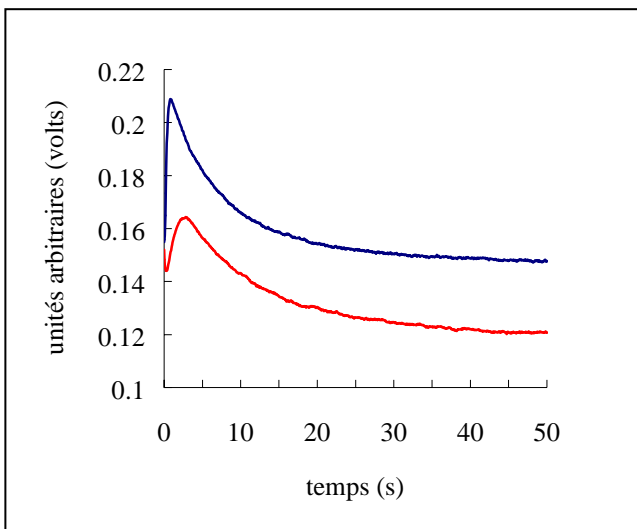
Les hématies normales présentent une cinétique plus rapide que les hématies de phénotype Colton. Les valeurs de perméabilité obtenues avec cette technique sont $(1,32 \pm 0,09) \times 10^{-2}$ cm/s et $(2,16 \pm 0,16) \times 10^{-3}$ cm/s pour les hématies normales et Colton, respectivement. Ces valeurs sont en accord avec la littérature (Mathai *et al.*, 1996) et montrent que la perméabilité hydrique des globules rouges Colton est plus faible que celle des cellules normales.

Cependant, la P_f des globules rouges Colton ne permet pas de dire que l'eau passe par diffusion passive à travers la membrane et qu'une ou d'autres protéines assurent encore la fonction de transport d'eau.

III.C.2.b Cinétique d'efflux de glycérol par spectrophotomètre à flux interrompu

La technique de spectrophotométrie à flux interrompu nous a permis d'avoir un aperçu des cinétiques de transport de glycérol à travers la membrane des globules rouges avant de calculer les valeurs de perméabilité au glycérol par filtration ultra-rapide. Pour cela, un gradient de 100 mM de glycérol de l'extérieur vers l'intérieur est appliqué aux hématies. Les cinétiques sont visualisées sur la figure ci-dessous.

Figure III.7: Cinétiques typiques d'efflux de glycérol obtenues après un choc hyperosmotique de 100 mM de glycérol



La cinétique obtenue pour les globules rouges normaux est en bleu et celle obtenue pour les globules rouges Colton est en rouge.

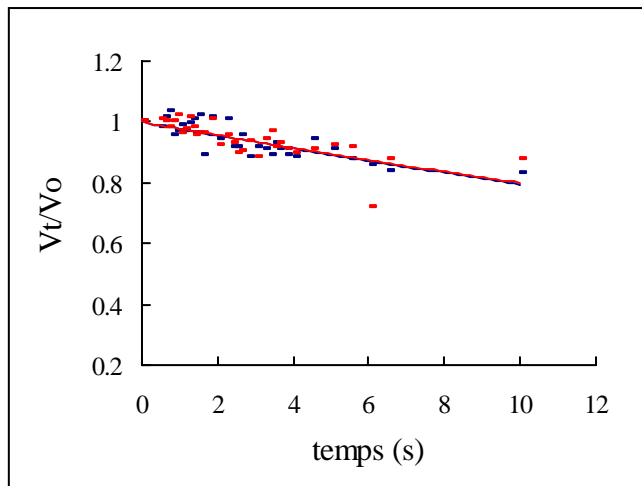
On observe une augmentation rapide de l'intensité lumineuse représentant la sortie d'eau, suivie d'une diminution lente, provenant de l'entrée de glycérol, provoquant le regonflement des hématies

La première partie des cinétiques confirme que les globules rouges normaux présentent une sortie d'eau plus rapide que les Colton. La deuxième partie des courbes montre les cinétiques d'entrée de glycérol sur lesquelles vont être calculées les constantes de vitesse d'efflux de glycérol. Elles sont de $0,12 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ et $0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ pour les normaux et les Colton, respectivement. Aucune différence significative n'est donc observée entre les constantes de vitesse des flux de glycérol des deux types de globules rouges humains par cette technique.

III.C.2.c Perméabilité au glycérol par filtration ultra-rapide

La figure ci-dessous montre les cinétiques d'efflux de glycérol à travers les fantômes d'hématies normales et Colton équilibrés avec 100 mM de glycérol marqué au carbone 14 et rincés avec 100 mM de raffinose afin d'être dans des conditions isoosmotiques.

Figure III.8: *Efflux de glycérol à travers des fantômes d'hématies obtenus par filtration ultra-rapide*



La cinétique obtenue pour les fantômes d'hématies normales est représentée en bleu et celle obtenue avec les fantômes d'hématies Colton est en rouge.

Encore une fois, aucune différence significative n'est observée. Les valeurs de perméabilité calculées à 20°C sont respectivement de $1,4 \times 10^{-6}$ cm/s et $1,6 \times 10^{-6}$ cm/s, pour les fantômes normaux et Colton. Ces résultats montrent que le transport de glycérol n'est pas altéré dans les membranes des hématies humaines de phénotype Colton. L'aquaporine-1 n'est donc pas impliquée dans la perméabilité élevée de glycérol des hématies humaines.

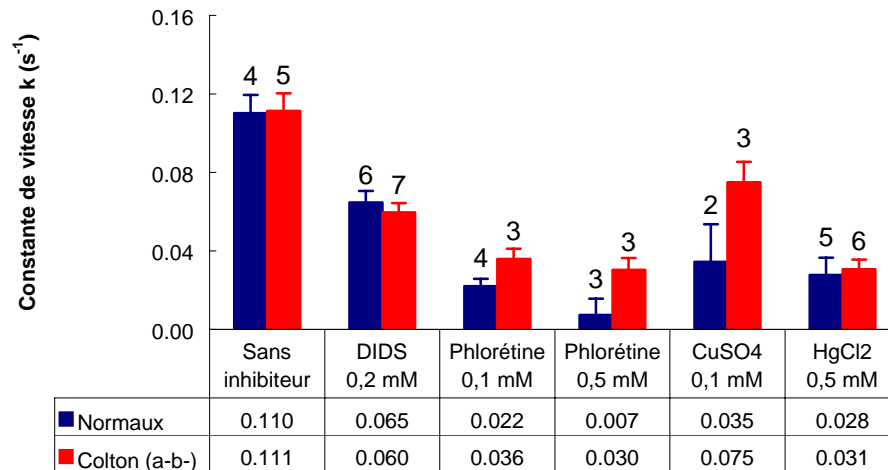
III.C.2.d Inhibition des transports d'eau et de glycérol

Des inhibiteurs connus du transport d'eau par AQP1 et AQP3 et du transport de glycérol ont été testés sur les globules rouges normaux et Colton par spectrophotométrie à flux interrompu. Cette expérience permet de savoir si les inhibiteurs ont un effet similaire sur les transports observés dans les deux phénotypes de cellules. De plus, nous pourrions savoir si les globules rouges Colton ne possédant pas AQP1 ont une protéine supplémentaire permettant le passage de l'eau, et si le transport d'eau est alors inhibable.

Inhibition du flux de glycérol.

Les cinétiques de flux de glycérol ont été réalisées en induisant un gradient sortant de glycérol tout en restant en conditions iso-osmotique par l'ajout d'un gradient entrant de saccharose. Ainsi, on provoque une sortie de glycérol dont les constantes de vitesse peuvent être mesurées et analysées.

Figure III.9: Inhibition du transport de glycérol à travers les érythrocytes normaux et Colton



Les globules rouges normaux (en bleu) ou Colton (en rouge) sont soumis à un gradient entrant de glycérol de 100 mM. Les inhibiteurs sont ajoutés 10 minutes (ou 5 minutes pour HgCl₂) avant les mesures. Les résultats sont les moyennes d'un nombre d'expériences indiqué sur les histogrammes.

La figure ci-dessus montre les effets de différents inhibiteurs sur le transport de glycérol obtenu sur les globules rouges normaux (A) et Colton (B). On observe que 0,2 mM de DIDS (4,4'-diisothiocyanato-stilbène-2,2'-disulfonic acid) inhibe d'environ 45% le transport de glycérol dans les deux types de globules rouges. La phlorétine est un inhibiteur encore plus puissant puisqu'il ne reste plus que 20% et 33% du transport en présence d'une concentration de 0,1 mM et 7% et 27% avec 0,5 mM de l'agent pour les hématies normales et Colton, respectivement. Le sulfate de cuivre n'inhibe pas le transport de façon homogène dans les deux types d'hématies. Il inhibe le transport de glycérol des globules rouges normaux à 69% et des globules rouges Colton à 33%.

Après avoir testé l'effet de trois inhibiteurs du transport de glycérol, nous avons utilisé un inhibiteur des flux d'eau, le chlorure de mercure. En effet, il est connu que le mercure est capable de se fixer sur les groupements thiols des cystéines de certaines aquaporines, obstruant ainsi le pore hydrique et diminuant la fonction de transport d'eau de ces protéines. Ceci va permettre de savoir si le mercure est également capable d'interagir avec une cystéine faisant partie du pore laissant passer les molécules de glycérol. En aucun cas cette expérience ne pourra démontrer si le pore hydrique et le pore du glycérol n'en font qu'un, dans le cas où AQP3 assurerait ces deux fonctions dans les globules rouges Colton, et que ces deux fonctions seraient inhibées par le mercure, puisque le mercure pourrait se fixer sur des cystéines différentes dans la protéine. Pour le vérifier, il suffirait peut-être de muter les cystéines une par une et de tester ensuite la fonction des protéines mutées.

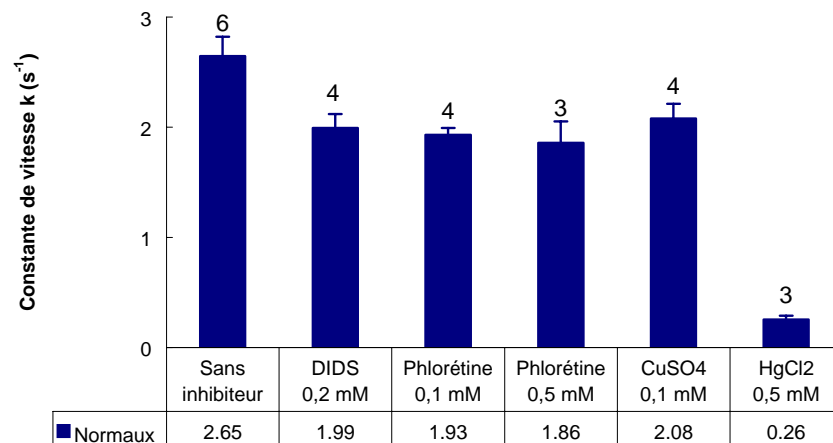
La figure montre que le chlorure de mercure inhibe également le flux de glycérol à travers les membranes des globules rouges normaux (75% d'inhibition) et des globules rouges Colton (72% d'inhibition). Ainsi, une cystéine est présente dans le pore du glycérol avec laquelle le mercure serait capable d'interagir pour bloquer la fonction de transport de glycérol de la protéine. Ceci avait déjà été montré par Ishibashi en 1994 sur des ovocytes exprimant AQP3 dont la perméabilité au glycérol était totalement inhibée par 1 mM de chlorure de mercure (Ishibashi *et al.*, 1994).

Toutes les molécules utilisées inhibent le transport de glycérol aussi bien dans les érythrocytes de phénotype normal que dans les érythrocytes de phénotype Colton, et ceci de manière similaire en terme d'efficacité démontrant l'existence d'une même protéine pour la fonction de transport de glycérol.

Inhibition du flux d'eau.

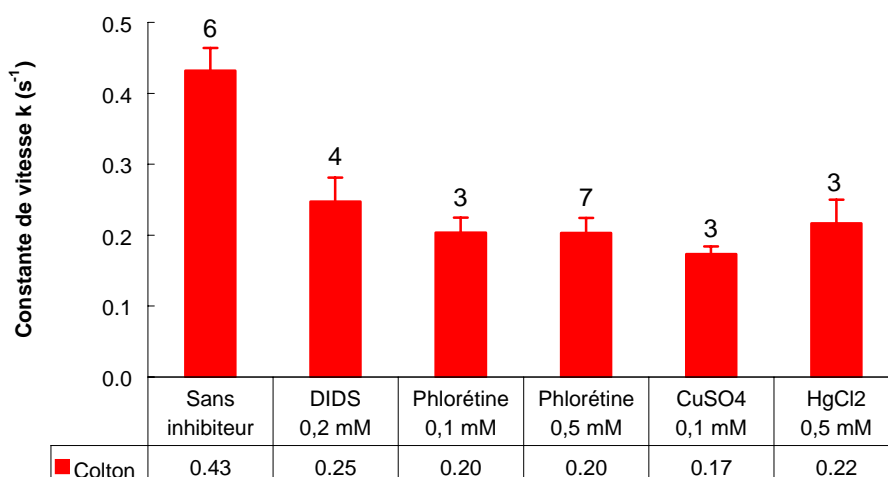
Nous avons utilisé les mêmes inhibiteurs cités précédemment afin de vérifier si les molécules inhibant généralement le transport de glycérol sont aussi capables de bloquer le transport d'eau. Contrairement aux composés mercuriels, nous ne savons pas comment agissent ces inhibiteurs mais ils n'interagissent pas avec les cystéines. Nous observons que le DIDS, la phlorétine et le sulfate de cuivre, utilisés à la même concentration que précédemment, ont peu d'effet sur le flux d'eau des érythrocytes normaux. Par contre, ils inhibent d'environ 50% celui des érythrocytes Colton. Le flux d'eau résiduel dans les globules rouges de phénotype Colton, qui n'est pas dû à AQP1, semble impliquer une protéine sensible aux inhibiteurs des transports de glycérol, auxquels AQP1 serait insensible.

Figure III.10: Inhibition du transport d'eau des érythrocytes normaux



Les globules rouges normaux sont mélangés à une solution hyperosmotique de 100 mM de saccharose. Les résultats sont la moyenne d'un certain nombre d'expérience indiqué sur les histogrammes.

Figure III.11: Inhibition du transport d'eau des érythrocytes Colton



Les globules rouges Colton sont mélangés à une solution hyperosmotique de 100 mM de saccharose. Les résultats sont la moyenne d'un certain nombre d'expérience indiqué sur les histogrammes.

Le chlorure de mercure, inhibiteur puissant des flux hydriques à travers les aquaporines, inhibe à 90% et à 50% le transport d'eau à travers les globules rouges normaux et Colton, respectivement. Cette molécule agit donc sur AQP1 mais aussi sur la protéine responsable du transport hydrique résiduel des Colton.

Le transport de glycérol des globules rouges humains est donc inhibé par le DIDS, la phlorétine et le sulfate de cuivre. Ces trois composés inhibent également le transport d'eau résiduel des globules rouges Colton, alors qu'ils n'inhibent pratiquement pas le transport d'eau issu du passage à travers AQP1. Le mercure bloque aussi bien les transports d'eau et de glycérol des globules rouges humains normaux et Colton. L'observation des expériences effectuées sur les globules rouges Colton indique que la protéine permettant le passage d'eau et de glycérol à travers la membrane de ces cellules est sensible à tous les composés testés.

III.D. DISCUSSION-CONCLUSION

AQP1 est abondamment présente dans le globule rouge humain et assure la majeure partie du transport hydrique à travers la membrane. Cette cellule est également capable d'assurer un flux de glycérol rapide de part et d'autre de sa membrane. Nous avons montré que la perméabilité au glycérol était liée à la présence d'AQP3 dans les globules rouges. En effet, la perméabilité au glycérol étant équivalente dans les globules rouges normaux et dans les globules rouges Colton négatif, elle ne peut être attribuée à AQP1. Connaissant certains paramètres pharmacologiques d'AQP3 exprimé dans les ovocytes de xénope, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs sur les transports d'eau et de glycérol des globules rouges normaux et Colton. Dans ces expériences, les inhibiteurs couramment utilisés pour bloquer les transports de glycérol inhibent de la même façon le transport de glycérol des globules rouges humains normaux et Colton, impliquant la même protéine dans les deux cas. Nous avons également montré que les inhibiteurs testés diminuent le flux d'eau résiduel des membranes d'érythrocytes Colton de 50% et que cette perméabilité pourrait bien être attribuée à la présence d'AQP3. De plus, il avait été montré qu'un transport d'eau sensible au PCMB était encore présent dans les membranes d'hématies Colton, suggérant la présence d'une autre protéine jouant le rôle de canal hydrique (Mathai *et al.*, 1996).

Le nombre d'AQP1 dans la membrane du globule rouge a été estimé à 200 000 (Denker *et al.*, 1988). La perméabilité hydrique globale (P_f) dépend de la quantité de canaux hydriques dans la membrane. En considérant qu'AQP3 est le seul canal hydrique des globules rouges Colton, et connaissant les perméabilités hydriques unitaires, on peut estimer le nombre d'AQP3 par hématie.

Ainsi, d'après l'équation:

$$Pf_{colton} = \frac{(n_{AQP3} \times pf_{AQP3})}{S} + Pf_{lipides}$$

où Pf_{Colton} représente la perméabilité hydrique globale des hématies Colton ($2,16 \times 10^{-3}$ cm/s); n_{AQP3} , le nombre d'AQP3 dans les globules rouges normaux et colton; pf_{AQP3} , la perméabilité hydrique unitaire d'AQP3 ($2,1 \times 10^{-14}$ cm³/s (Yang et Verkman, 1997)), $Pf_{lipides}$, la perméabilité diffusionnelle à travers les lipides (10^{-4} cm/s) et S , la surface d'un globule rouge (129×10^{-9} cm²), le nombre d'AQP3 serait estimé à environ 13000 monomères d'AQP3.

Ceci est un calcul effectué à partir de nos données expérimentales obtenues sur le globule rouge Colton. On pourrait aussi calculer le nombre de canaux AQP3 grâce à la P_f du globule rouge normal et aux valeurs de la littérature. Ainsi:

$$Pf_{normaux} = \frac{n_{AQP3} \times pf_{AQP3}}{S} + \frac{n_{AQP1} \times pf_{AQP1}}{S} + Pf_{lipides}$$

En prenant $Pf_{normaux}$ égal à $1,32 \times 10^{-2}$ cm/s, pf_{AQP1} égal à 6×10^{-14} cm³/s (Yang et Verkman, 1997) et n_{AQP1} à 200 000 (Denker *et al.*, 1988), on trouve une valeur négative, et pour que n_{AQP3} soit supérieur à 1, il faudrait que n_{AQP1} soit inférieur à 28000. Finalement, beaucoup de valeurs ne sont qu'estimées comme le nombre de canaux AQP1 et les valeurs de p_f , le résultat peut alors s'éloigner rapidement de la valeur réelle. Pour cela, nous considérons que la valeur la plus vraisemblable vient du calcul par la P_f des globules rouges Colton, c'est à dire un nombre de 13 000 monomères d'AQP3 dans les globules rouges humains.

La découverte de la présence d'AQP3 dans les globules rouges humains pose la question du rôle de cette protéine dans ces cellules. AQP1 étant la protéine majeure du transport hydrique à travers la membrane, la présence d'AQP3 paraît plutôt nécessaire par son caractère de transporteur de glycérol. Cette protéine semble suffisante pour remplacer AQP1 dans les globules rouges Colton et assurer également un flux d'eau minimum pour le confort des personnes Co (a-b-).

La colocalisation de deux protéines de la famille des MIPs se rencontre déjà dans plusieurs tissus; colocalisations d'AQP3 et AQP4 dans la membrane basolatérale des cellules principales du canal collecteur de rein, d'AQP1 et d'AQP7 dans les membranes de bordure en brosse du rein, d'AQP7 et d'AQP8 dans les testicules de rat. On peut comprendre la présence de facilitateurs de glycérol dans le testicule et le foie où un métabolisme important du glycérol a été décrit mais aucun métabolisme n'a été décrit dans les hématies. Le rôle d'un transporteur de glycérol dans les hématies humaines pourrait être le même que celui du transporteur d'urée comme l'avait décrit Macey (Macey, 1984). Ces perméabilités élevées aux solutés protégeraient les globules rouges lors de leur passage dans des zones d'osmolarité élevée comme c'est le cas dans les régions profondes de la médullaire du rein, mais toute autre hypothèse n'est pas à écarter.

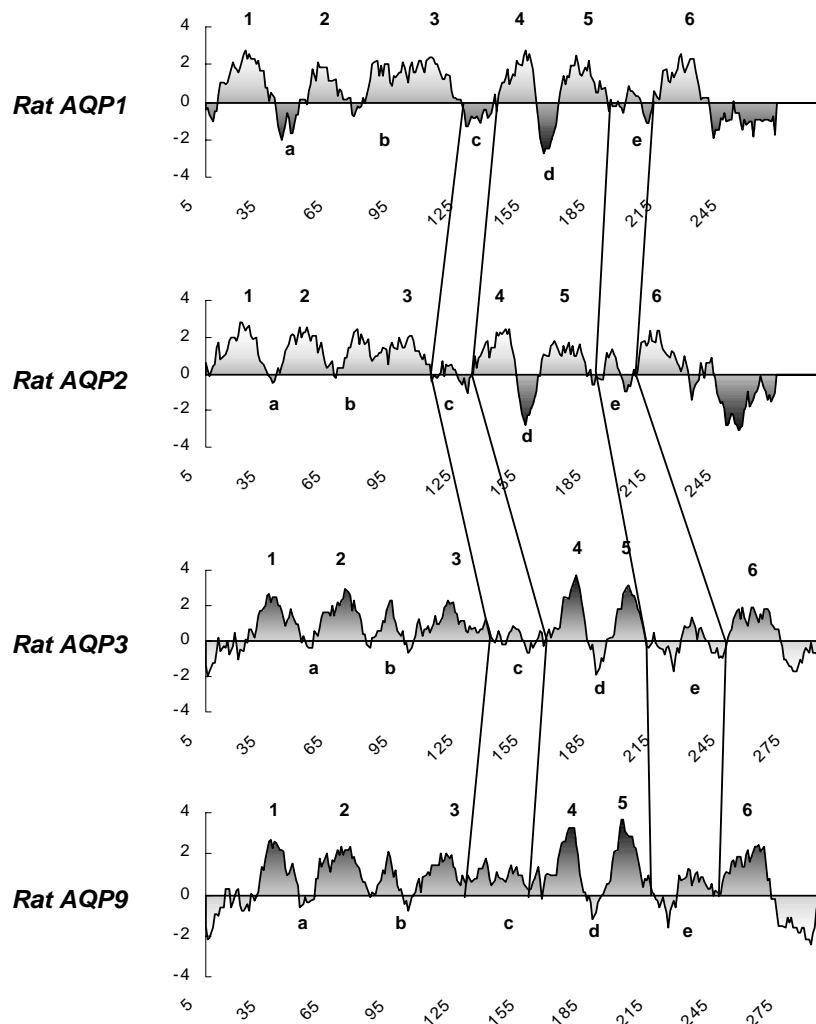
CHAPITRE IV. PROPRIETES FONCTIONNELLES D'AQP3 ET DE CHIMERES AQP2-AQP3 EXPRIMEES DANS L'OVOCYTE DE XENOPE

IV.A. INTRODUCTION

Le but de ce travail est de déterminer les séquences impliquées dans la sélectivité des protéines MIPs, en particulier chez les aquaporines et les aquaglycéroporines. Ces deux types de protéines MIPs ont comme point commun le transport d'eau mais elles se distinguent par leur capacité à transporter les solutés. Le modèle hypothétique de la structure d'AQP1, le modèle du sablier, impliquerait les boucles B et E qui se replieraient dans la membrane lipidique pour former le pore (Jung *et al.*, 1994b), ces boucles pourraient donc jouer un rôle dans la sélectivité. Afin de déterminer d'autres séquences susceptibles d'être impliquées dans la sélectivité, nous avons tout d'abord effectué une étude comparative des séquences primaires de ces deux types de protéines MIPs.

La comparaison des profils d'hydrophobicité de deux aquaporines et de deux aquaglycéroporines est représentée sur la figure ci-dessous.

Figure IV.1: Profils d'hydrophobicité de certains canaux hydriques de rat



Les profils d'hydrophobicité ont été construits à partir de l'échelle de Kyte et Doolittle dont la fenêtre a été choisie égale à 9.

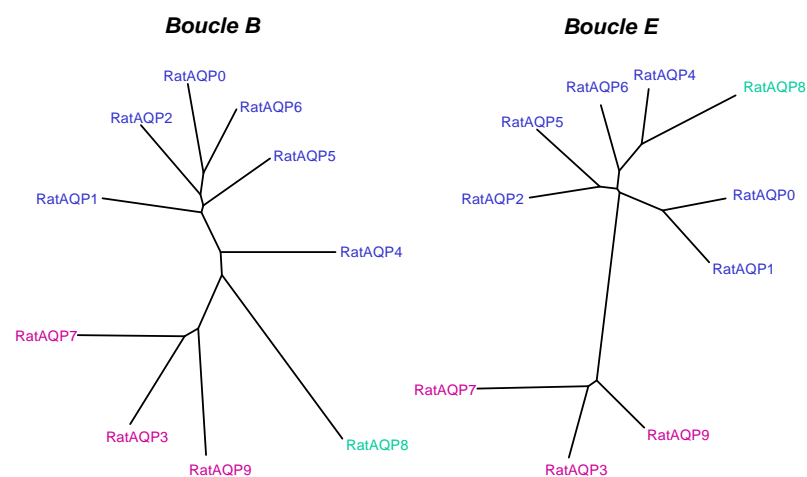
On note une séquence N-terminale longue pour les aquaglycéroporines. Tandis que la jonction entre le début de la boucle B et le 3^{ème} passage transmembranaire est complètement hydrophobe dans les aquaporines, une partie de celle-ci est plus hydrophile dans les aquaglycéroporines.

Inversement, les jonctions entre les segments 3 et 4 (boucle C) et les segments 4 et 5 (boucle D) sont moins hydrophobes dans les aquaporines.

On note une inversion prononcée de l'hydrophobicité au milieu de la boucle E des aquaglycéroporines. La totalité de la boucle C des aquaglycéroporines est plutôt hydrophobe et elle pourrait aussi bien être en contact avec l'intérieur de la bicouche lipidique.

Si l'on construit les arbres phylogénétiques en se restreignant à certaines parties des canaux hydriques, les boucles B, C et E ainsi que le 2^{ème} passage transmembranaire, on s'aperçoit que les groupes des aquaporines et des aquaglycéroporines sont très divergents au niveau de la boucle E, suggérant un rôle possible de la boucle E dans la sélectivité. En revanche, l'arbre phylogénétique réalisé sur la boucle B montre une divergence moins grande entre les membres de la famille mais le regroupement des membres de chaque sous-famille est encore visible. Notons que la boucle B de l'aquaporine-8 de rat possède plus d'identité avec les aquaglycéroporines mais que sa boucle E est plus proche de celle des aquaporines.

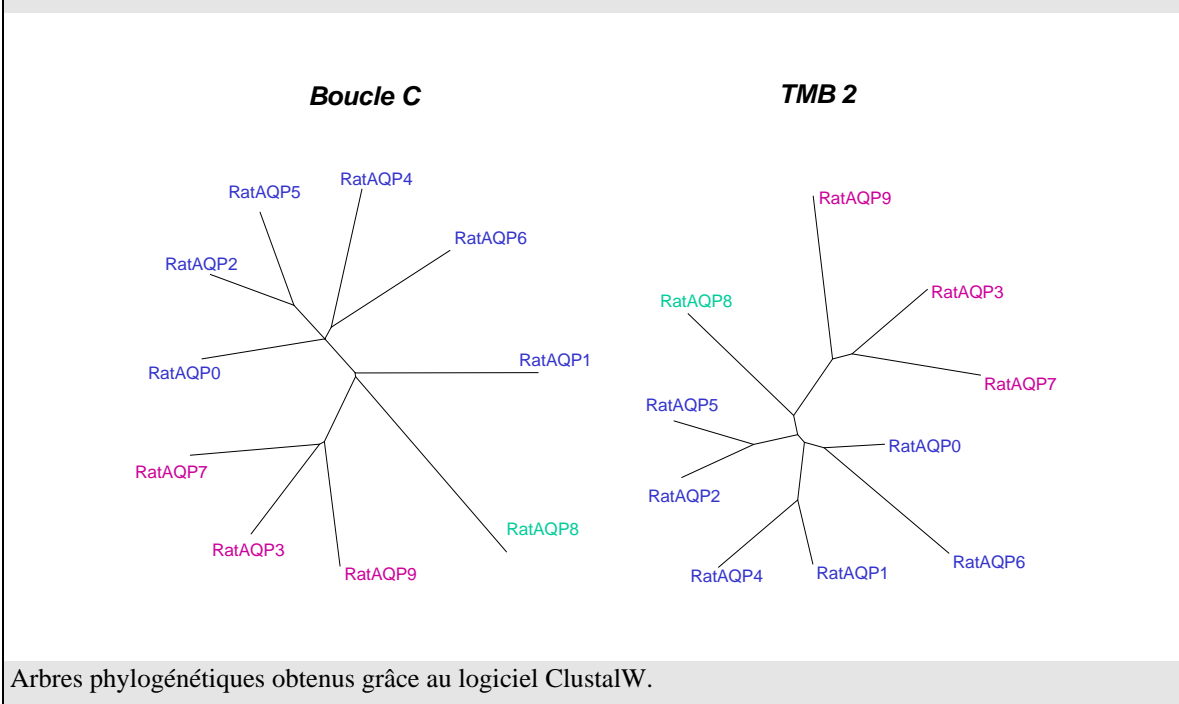
Figure IV.2: *Arbre phylogénétique des boucles B et E des canaux hydriques de rat*



Arbres phylogénétiques obtenus grâce au logiciel ClustalW.

Le regroupement des protéines de chaque sous-famille est aussi visible dans les autres segments mais la divergence est moins importante. En particulier, l'arbre réalisé sur le 2^{ème} passage transmembranaire montre moins de divergence entre les membres de chaque famille.

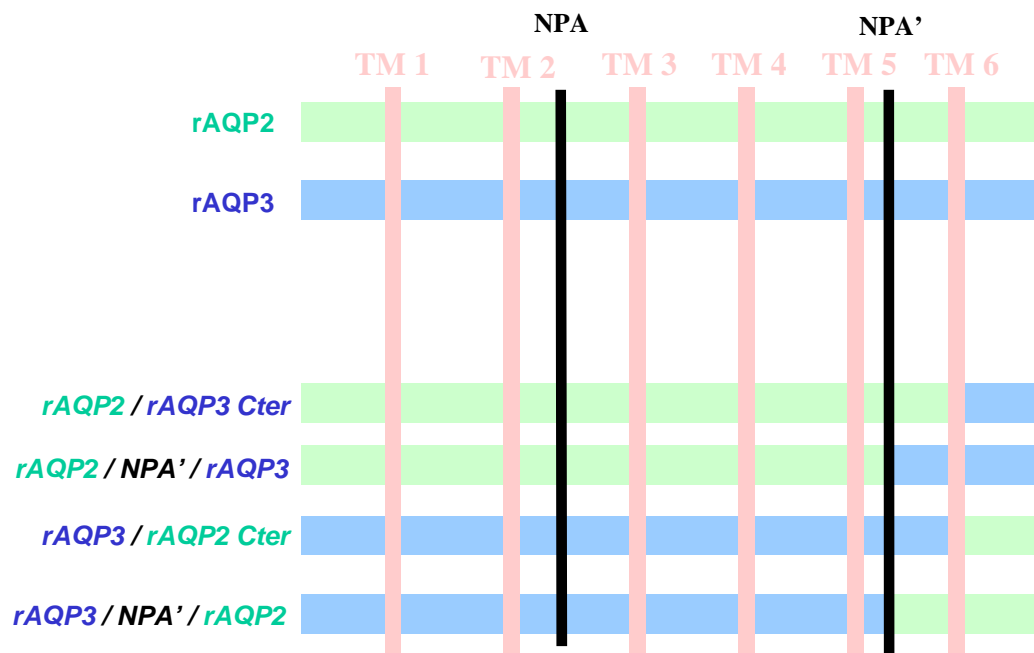
Figure IV.3: *Arbre phylogénétique de la boucle C et du 2ème passage transmembranaire des canaux hydriques de rat*



La boucle E est donc la partie de la protéine où il y a le moins d'identité de séquence entre les aquaporines et les aquaglycéroporines.

Nous avons choisi de construire des chimères entre AQP2 et AQP3 dans lesquelles les séquences C-terminales ont été inversées entre les deux protéines, contenant ou non la boucle E. Les inversions ont été effectuées soit à partir de la fin du dernier segment transmembranaire (AQP3-AQP2 Cter et AQP2-AQP3 Cter), c'est à dire les séquences C-terminales cytoplasmiques, soit à partir du 2^{ème} motif NPA (AQP3-NPA' AQP2 et AQP2-NPA' AQP3). Les schémas des chimères sont représentés sur la figure ci-dessous.

Figure IV.4: Schéma des 4 chimères



Les segments de l'AQP2 de rat sont représentés en vert et ceux de l'AQP3 de rat sont en bleu. Les segments ont été inversés soit à partir du 2^{ème} motif NPA (rAQP/NPA'/rAQP), soit à partir de la fin du 6^{ème} segment transmembranaire (rAQP/rAQP Cter).

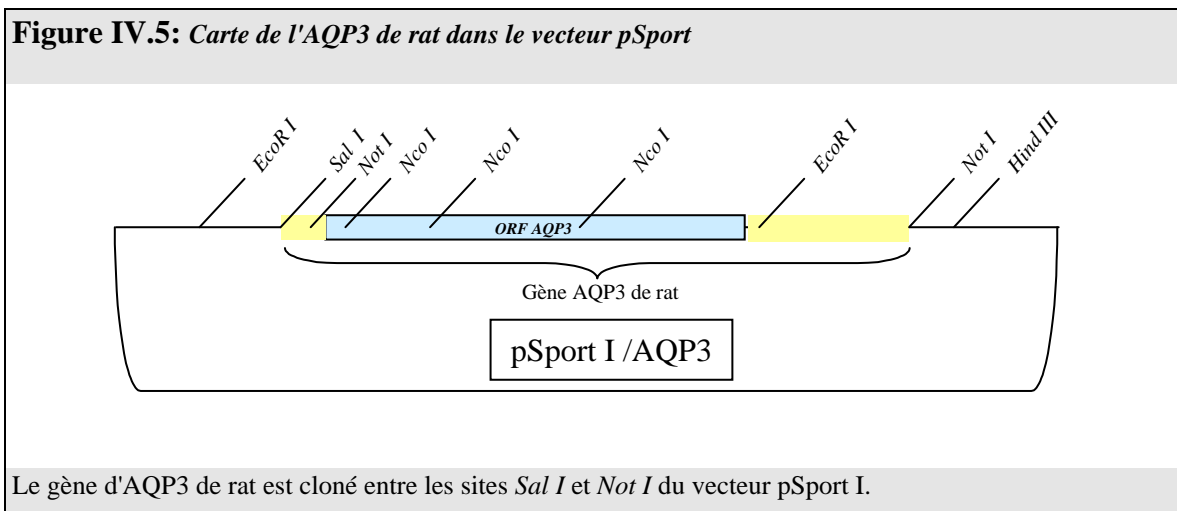
Les mesures des perméabilités des chimères et des canaux hydriques sauvages sont réalisées après expression dans l'ovocyte de xénope.

IV.B. MATERIELS ET METHODES

IV.B.1. Construction et clonage d'AQP2, d'AQP3 et des chimères dans le vecteur T7TS

Clonage d'AQP3 dans le vecteur T7TS (en collaboration avec Vincent Laizé):

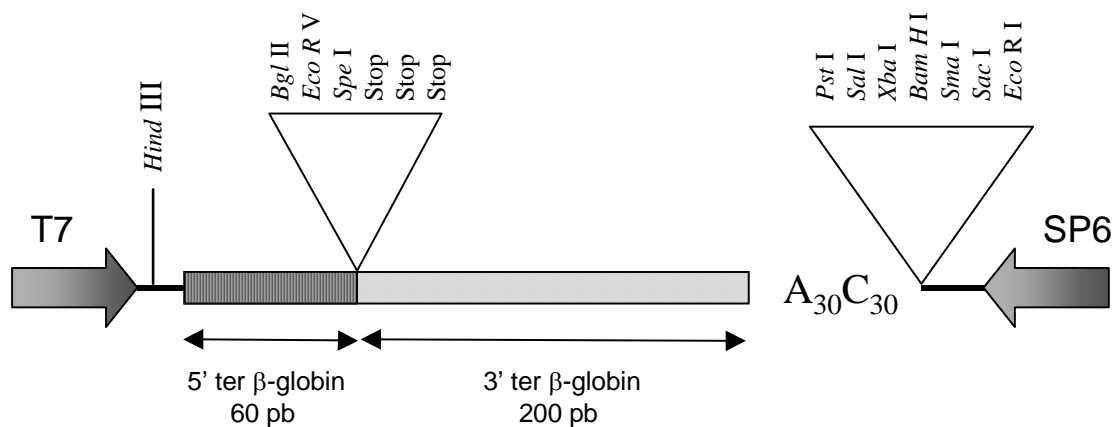
Le fragment d'ADN codant pour l'AQP3 de rat, inséré entre *Sal I* et *Not I* du site de clonage multiple du vecteur pSport nous a été fourni par le Docteur M. Echevarria (figure ci-dessous).



Le plasmide pSport/AQP3 a été digéré avec les enzymes de restriction *EcoR I* selon le protocole décrit par New England Biolabs (NEB), puis des extrémités franches ont été obtenues par l'action de la polymérase Klenow. Les fragments obtenus ont été repris dans 1/6^{ème} de tampon de migration 6X (0,25% bleu de bromophénol, 30% glycérol) et séparés sur gel d'agarose 1% à faible point de fusion dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-acetate pH 8,3, 1 mM EDTA).

La bande d'agarose contenant le fragment d'environ 100 pb est découpée puis purifiée avec le kit "QIAEX II Gel Extraction Kit" selon le protocole fourni par Qiagen ou avec la β -agarase selon le protocole de NEB. Le culot d'ADN obtenu est repris dans 20 μ l de tampon TE (10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA). 1 μ l est déposé sur gel d'agarose pour quantifier le fragment d'ADN. Le fragment purifié est ligué dans le vecteur T7TS, digéré préalablement par *EcoR* V (dont une partie de la carte est représentée ci-dessous), par la T4 DNA ligase toute la nuit à 16°C selon le protocole NEB dans un rapport 50:1.

Figure IV.6: Partie du plasmide T7TS utilisé pour la transcription.

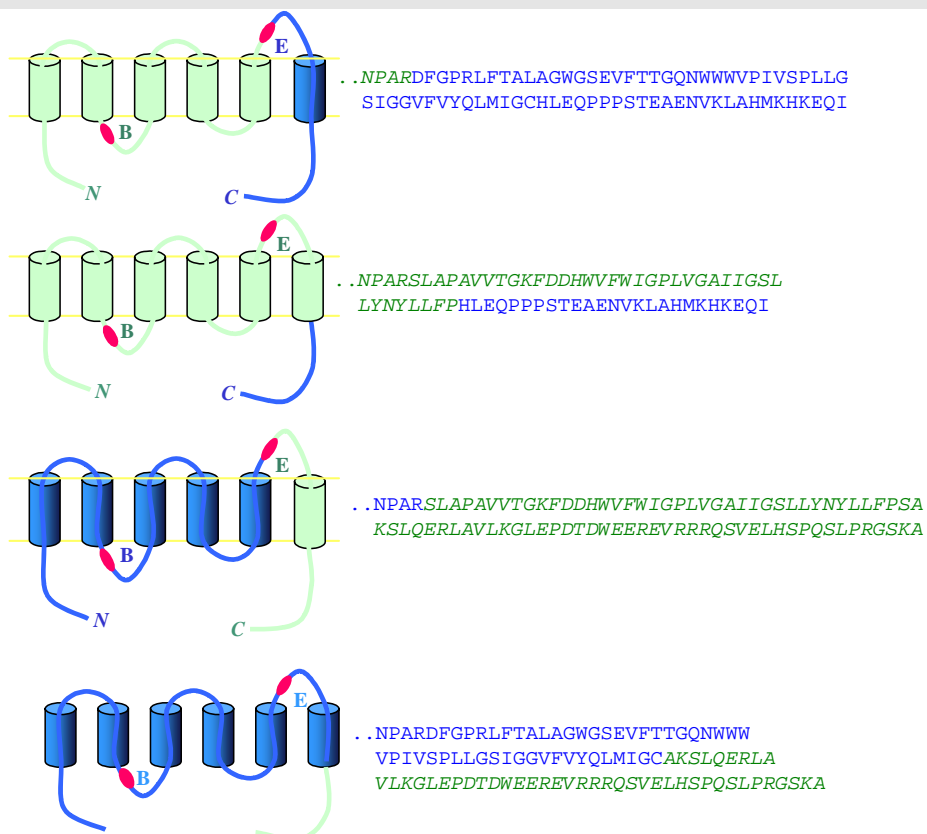


Les régions 5' et 3' du gène de la β -globine sont représentées de part et d'autre du site de clonage des gènes à transcrire composé de *Bgl* II, *EcoR* V et *Spe* I. La linéarisation du plasmide peut se faire en coupant au niveau du deuxième site de clonage composé de *Pst* I, *Sal* I, *Xba* I, *Bam*H I, *Sma* I, *Sac* I ou *EcoR* I, en ayant vérifié auparavant que le site utilisé est bien absent du gène à transcrire (*Xba* I dans notre cas).

Les ADNc codant pour l'AQP2 de rat et pour les chimères AQP2-AQP3 de rat ont été construits par mutagenèse à l'aide de la PCR *in vitro* dans le vecteur pBlueScript ou dans le vecteur pSport 2 délété entre *Sac* I et *Pst* I (Δ *Sac* I-*Pst* I) en collaboration avec Jean Mérot.

Le détail des différentes chimères construites est représenté dans le schéma suivant.

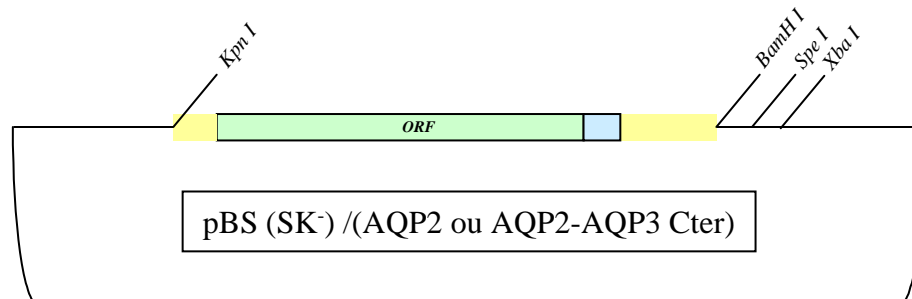
Figure IV.7: Séquences des chimères à l'extrémité C-terminale



Les parties correspondant à AQP2 sont en vert clair dans le schéma et en vert italique dans la séquence. Les parties correspondant à AQP3 sont en bleu foncé dans le schéma et en bleu dans la séquence.

Les vecteurs pBlueScript (SK⁻) contenant AQP2 ou la chimère AQP2-AQP3 Cter ont été digérés par l'enzyme *Kpn* I et des extrémités franches ont été obtenues après action de la polymérase Klenow. Le fragment d'environ 1000 paires de bases (pb) contenant les ORFs ont été obtenus après digestion avec *Spe* I et purification. Les ligations ont été réalisées entre le vecteur T7TS digéré avec *EcoR* V et *Spe* I et les fragments ci-dessus, comme décrit précédemment.

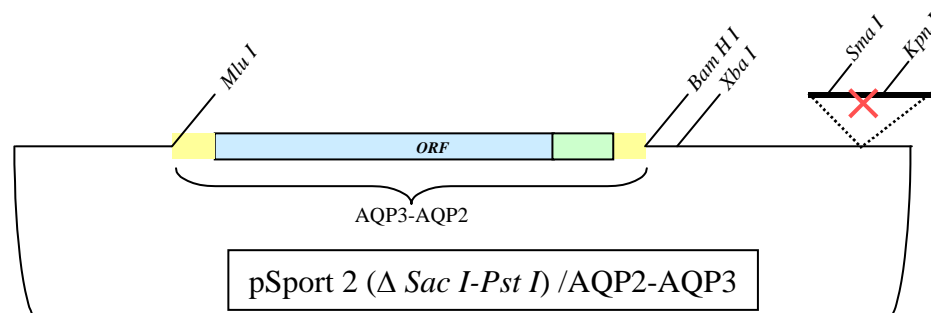
Figure IV.8: Carte du vecteur pBlueScript contenant AQP2 ou AQP2-AQP3 Cter



L'AQP2 de rat et la chimère AQP2-AQP3 Cter sont clonées dans le vecteur pBlueScript (SK⁻) entre les sites *Kpn* I et *Bam*H I.

Les vecteurs pSport 2 délétés contenant les chimères AQP3-AQP2 ont été digérés par *Mlu* I avant l'obtention d'extrémités franches par action de la polymérase Klenow. Une digestion par *Xba* I (cohésif avec *Spe* I) a permis l'obtention d'un fragment d'environ 1000 pb qui a été cloné dans T7TS (digéré par *Eco*R V/*Spe* I).

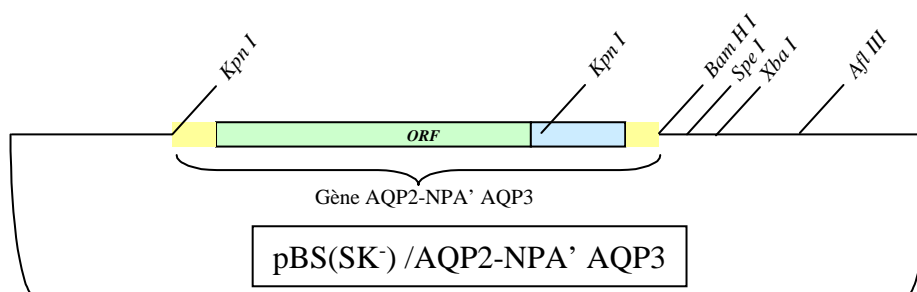
Figure IV.9: Carte du vecteur Psport 2 délété contenant AQP3-NPA'AQP2 et AQP3-AQP2 Cter



Le vecteur pSport 2 a été délété d'une partie de son site de clonage (entre *Sac* I et *Pst* I) afin d'éliminer certains sites également présents dans les ORFs tels *Sma* I et *Kpn* I.

La chimère AQP2-NPA' AQP3 est clonée dans le vecteur pBlueScript entre *Kpn* I et *Bam*H I. Un site *Kpn* I étant présent dans la partie comprise entre le 2^{ème} motif NPA et le début du 6^{ème} passage transmembranaire (voir carte ci-dessous), nous avons dû effectuer une digestion partielle avec *Kpn* I. Nous avons tout d'abord digéré par *Afl* III, puis par *Kpn* I partiellement. Nous avons rendu les extrémités franches puis digéré par *Spe* I. Le fragment obtenu, purifié, a été cloné dans T7TS digéré par *Eco*R V et *Spe* I.

Figure IV.10: Carte du vecteur pBlueScript contenant AQP2-NPA' AQP3



La chimère AQP2-NPA' AQP3 Cter est clonée dans le vecteur pBlueScript (SK⁻) entre les sites *Kpn* I et *Bam*H I.

Transformation des bactéries:

2 µl des produits de ligation servent à transformer 50 µl de bactéries supercompétentes *XL1 blue* (Stratagène) par choc thermique. Le mélange est effectué stérilement dans la glace où il est laissé 15 minutes. Il est ensuite incubé 45 secondes à 42°C puis remis dans la glace pendant 5 minutes. Les bactéries sont ensuite cultivées 1 heure à 37°C dans un milieu riche SOC (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l extrait de levure, 0,5 g/l NaCl et 20 g/l glucose), étalées sur boîtes de Pétri contenant un milieu LB-Agar (Luria-Bertoni: 10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l extrait de levure, 10 g/l NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées toute une nuit à 37°C. Seules les bactéries transformées sont capables de pousser en présence d'ampicilline.

Minipreps:

Afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide contenant l'insert dans le bon sens, l'ADN plasmidique est isolé des bactéries de quelques colonies sélectionnées au hasard, par une technique de lyse alcaline ("Minipreps"). Les bactéries sont prélevées stérilement et mises en culture une nuit à 37°C dans 3 ml de milieu LB contenant 100 µg/l d'ampicilline. 2 ml de la suspension est centrifugé pendant 5 minutes à 10000g à 4°C. Le culot de bactéries est resuspendu dans 100 µl de tampon GTE (50 mM glucose, 25 mM Tris pH 8.00, 10 mM EDTA). L'ajout de 200 µl d'une solution alcaline (0,2 N NaOH, 1% SDS) permet de lyser les bactéries. Après l'addition de 200 µl d'une solution d'acétate de potassium (3 M Kac, 11,5% acide acétique), le mélange est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 20000g. Le surnageant (environ 500 µl) est mélangé à 1 ml d'éthanol 100% et le culot d'ADN plasmidique est récupéré après une centrifugation de 10 minutes à 20000g et lavé dans 100 µl d'éthanol 70%, séché à 55°C puis repris dans 50 µl de TE contenant 20 µg/ml d'ARNases. Des digestions sur 1 µl de chaque préparation d'ADN plasmidique avec des enzymes de digestion judicieusement choisies suivi d'un dépôt sur gel d'agarose permet de sélectionner les clones de bactéries qui ont le plasmide contenant l'insert voulu.

Maxipreps:

La quantité nécessaire de plasmide pour préparer la matrice d'ADN en vue de la transcription est de 50 µg. Une préparation d'ADN plasmidique en plus grande quantité est réalisée par une "maxiprep". 100 ml de culture de bactéries sont cultivées à 37°C toute une nuit dans un milieu contenant 9/10^{ème} de milieu TB (Terrific-Broth, 12 g Bacto-Tryptone, 24 g d'extrait de levure, 4 ml de glycérol, qsp 900 ml) et 1/10^{ème} de milieu phosphate (2,31 g de KH₂PO₄, 12,54 g de K₂HPO₄ qsp 100 ml). Les bactéries sont centrifugées pendant 10 minutes à 5000g à 4°C puis le culot est repris dans 5 ml de GTE, laissé à 4°C durant 5 minutes. 10 ml de solution alcaline NaOH/SDS sont ajoutés et le tube est laissé 5 minutes à 4°C. 8 ml de solution d'acétate de potassium sont ajoutés et le tout est à nouveau laissé 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré après une centrifugation de 15 minutes, 20000g, 4°C et l'ADN est précipité par l'ajout de 14 ml d'isopropanol 100%. Après 5 minutes de repos à température ambiante, le tube est mis à centrifuger 15 minutes à 20000g et le culot

est séché à 55°C puis repris dans 1 ml de TE contenant 10 µg/ml de RNase A, puis incubé à 37°C pendant 30 minutes, au bout de 15 minutes, la protéinase K est ajoutée à 100 µg/ml. L'ADN est ensuite nettoyé (élimination des protéines) par une extraction au PCI (1/2 volume de phénol pH 7,5, 9/20^{ème} volume de chloroforme et 1/20^{ème} d'alcool isoamylique) puis au CIAA (chloroforme: acide isoamylique). 1 ml de PCI est ajouté et le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 6000g. La phase aqueuse supérieure est prélevée, ramenée à 1 ml avec du TE puis mélangée à un volume de CIAA, centrifugé à 6000 × g pendant 5 minutes. L'ADN du surnageant, complété avec du TE, est précipité avec 570 µl de PEG/NaCl (20% PEG 800, 2,5 M NaCl). Le culot obtenu après une centrifugation de 15 minutes à 20000g à 4°C est lavé avec 750 µl d'éthanol 70% puis une centrifugation de 5 minutes à 20000g permet l'obtention d'un culot propre qui est séché et repris dans 400 µl de TE. L'ADN est quantifié par mesure de la DO à 260 nm (1 unité DO_{260nm} = 50 µg/ml d'ADN). Parallèlement, un dépôt de 1 µl de l'ADN plasmidique linéarisé sur gel d'agarose est effectué.

Transcription in vitro:

Le vecteur T7TS porte les régions 5' et 3' non traduites du gène de la β-globine de xénope, permettant du transcrit une fois injecté dans les ovocytes (Preston *et al.*, 1992).

Les ARNc ont été synthétisés in vitro avec la T7 RNA polymérase en utilisant le kit mRNA capping kit (Stratagene). Les ARNm naturels ont un résidu 7-méthylguanosine lié à un triphosphate à leur extrémité 5'. Cette structure "en coiffe" (cap) est nécessaire à la stabilité des ARNs. L'utilisation du kit Stratagène permet l'ajout d'un analogue de cette coiffe, le 5'-7MeGpppG à l'extrémité 5'. Ainsi, l'ARNc exogène sera stable dans l'ovocyte grâce aux régions non codantes de la β-globine de xénope, d'une longue queue poly A en 3' et de cette coiffe en 5'.

Préparation de la matrice:

Ces étapes nécessitent l'utilisation de matériel et de solutions totalement débarrassés de RNAses ("RNase free") et le port de gants.

50 µg d'ADN plasmidique est linéarisé avec un enzyme ne coupant pas dans l'insert et placé à la fin du gène à transcrire (XbaI le plus souvent) dans un volume final de 250 µl. Le produit de digestion est traité avec 5 µl de protéinase K (1 µg/ml) pendant 30 minutes à 37°C. Une extraction au PCI puis au CIAA suivi d'une précipitation éthanolique (15 minutes à 4°C dans 1/10^{ème} V NaAc 3 M, pH 5,2 et 2,5 V d'éthanol 100%) et d'une centrifugation de 30 minutes à 15000g 4°C permet l'obtention d'un culot qui est lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, séché et repris dans 20 µl de TE.

Transcription in vitro:

A 4 µl de matrice d'ADN (à 2,5 µg/µl, soit 10 µg), est ajouté successivement 21 µl d'eau, 2 µl de rNTPs (10 mM rUTP, rATP, rCTP, 3 mM rGTP), 5 µl CAP analogue 10 mM, 2 µl DTT 0,75 M, 2 µl rGTP 1 mM, 2 µl RNAsine 40 U/µl, 10 µl de tampon 5 X (200 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 40 mM MgCl₂, 10 µl spermidine) et 2 µl d'ARN T7 polymérase à 50 U/µl. Le mélange est incubé pendant 90 minutes à 37 °C. La matrice est éliminée par une incubation supplémentaire de 30 minutes avec 2 µl de DNase I (5 U/µl). 200 µl d'eau sont ajoutés et une extraction au PCI puis au CIAA est réalisée. Après une précipitation éthanolique et une centrifugation pendant 15 minutes à 4°C à 15000 g, le culot obtenu est lavé 2 fois avec 500 µl d'éthanol 70%, séché et repris dans 30 µl d'eau.

La concentration de l'ARNc est estimée par mesure de la DO à 260 nm (1 unité DO_{260nm} = 40 µg/ml d'ARN). L'ARN est considéré pur et dépourvu de protéines si le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} est supérieur à 1,7. A partir de 10 µg de matrice, nous obtenons de 25 à 30 µg d'ARNc. L'intégrité des transcrits est vérifiée sur gel d'agarose non-dénaturant: 1 µl d'ARN est mélangé à 4 µl d'eau et à 5 µl de tampon de migration 2X, le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 minutes, mis dans la glace pendant 5 minutes et déposé sur le gel. Les ARNc sont ensuite aliquotés par 5 µl à une concentration de 200 ng/µl et conservés à - 80°C jusqu'au moment de l'injection.

IV.B.2. Les ovocytes de xénope

IV.B.2.a Préparation des ovocytes de xénope

Les ovocytes de stade V ou VI sont extraits de *Xenopus laevis*. Ils sont traités par 0,5 mg/ml de collagénase A (Boehringer) dans un milieu OR2 [82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7,5] pendant 1 heure à 25°C. Ils sont ensuite rincés avec l'OR2 contenant 1 g/l de sérum albumine bovine (BSA). Le décollement complet de l'enveloppe de collagène se termine en incubant les ovocytes dans une solution de 10 mM K₂HPO₄ à pH 6,5 pendant 1 heure à 25°C. Ils sont rincés avec une solution de Barth [88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,41 mM CaCl₂, 0,82 mM MgSO₄, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4] contenant 1 g/l de BSA. Les ovocytes sont conservés dans du Barth contenant l'antibiotique gentamycine (50 µg/ml) à 18°C.

Les ovocytes sont injectés avec 50 nl d'eau "RNase-free" ou d'ARNc à une concentration de 200 ng/µl (soit 10 ng) en général. L'ARNc est dénaturé pendant 5 minutes à 70°C et transféré dans la glace. Il est introduit dans une pipette, dont l'extrémité a un diamètre de 20 µm, à l'aide d'un micromanipulateur. La pointe de la pipette est introduite délicatement dans l'ovocyte au niveau de la bande équatoriale. 50 nl d'ARNc (10 ng) ou d'eau pour les ovocytes contrôles, sont injecté dans chaque ovocyte. Dans le cas des coinjections de chimères, 5 ng de chaque chimère sont injectés. Les ovocytes sont maintenus à 18°C dans le tampon Barth. Ce milieu est changé tous les jours jusqu'au moment de l'expérience.

La population d'ovocytes est inhomogène dans chaque ovaire et elle varie également d'un xénope à l'autre. Les ovocytes de xénope matures sont les plus gros (diamètre compris entre 0,9 et 1,3 mm) et possèdent une bande équatoriale très nette alors que les ovocytes non matures (de différentes tailles, 0,7 à 1,2 mm environ) ont une bande équatoriale plus floue. Nous avons donc choisi des populations homogènes d'ovocytes matures et d'ovocytes non matures petits pour certaines expériences, dont le diamètre est compris entre 0,7 et 0,9 mm, afin de ne pas les confondre avec les ovocytes matures.

IV.B.2.b Incubation des ovocytes avec la progestérone

Les ovocytes dans un état de maturation différente sont incubés avec 5 µg/ml de progestérone (Sigma) à différents moments avant les expériences de transport et pendant différentes durées:

- pendant 30 minutes, 18 heures avant le début des expériences (Prog 30' veille),
- pendant 30 minutes, juste avant le début de l'expérience (Prog 30' avant exp),
- toute la nuit jusqu'au début de l'expérience (Prog nuit).

IV.B.3. Analyse de l'expression des canaux hydriques dans les ovocytes

IV.B.3.a Immunotransfert

Trois jours après l'injection, les ovocytes (une dizaine en général) sont homogénéisés dans un tampon de lyse [7,5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4), 1 mM EDTA, 20 µg/ml PMSF, 1 µg/ml pepstatine A, 1 µg/ml leupeptine] à 4°C suivant le procédé de Preston *et al.* (Preston *et al.*, 1993). Le lysat est centrifugé à 750g pendant 5 minutes à 4°C pour enlever le jaune d'oeuf. Les membranes sont récupérées après centrifugation à 16000g pendant 30 minutes. Un lavage est effectué avant resuspension dans le tampon de lyse (10 µl par ovocyte). Le dosage au Micro BCA (Pierce) révèle une concentration d'environ 10 µg de protéines membranaires par ovocyte.

Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et révélées par la méthode de chimioluminescence. L'anticorps utilisé pour révéler AQP3 ou les chimères possédant l'extrémité C-terminales d'AQP3 est celui décrit précédemment. Les autres protéines (ayant l'extrémité C-terminale d'AQP2) sont révélées avec un anticorps anti-AQP2 dirigé contre le peptide de 15 résidus de l'extrémité C-terminale d'AQP2 de rat (Fushimi *et al.*, 1993).

IV.B.3.b Immunofluorescence

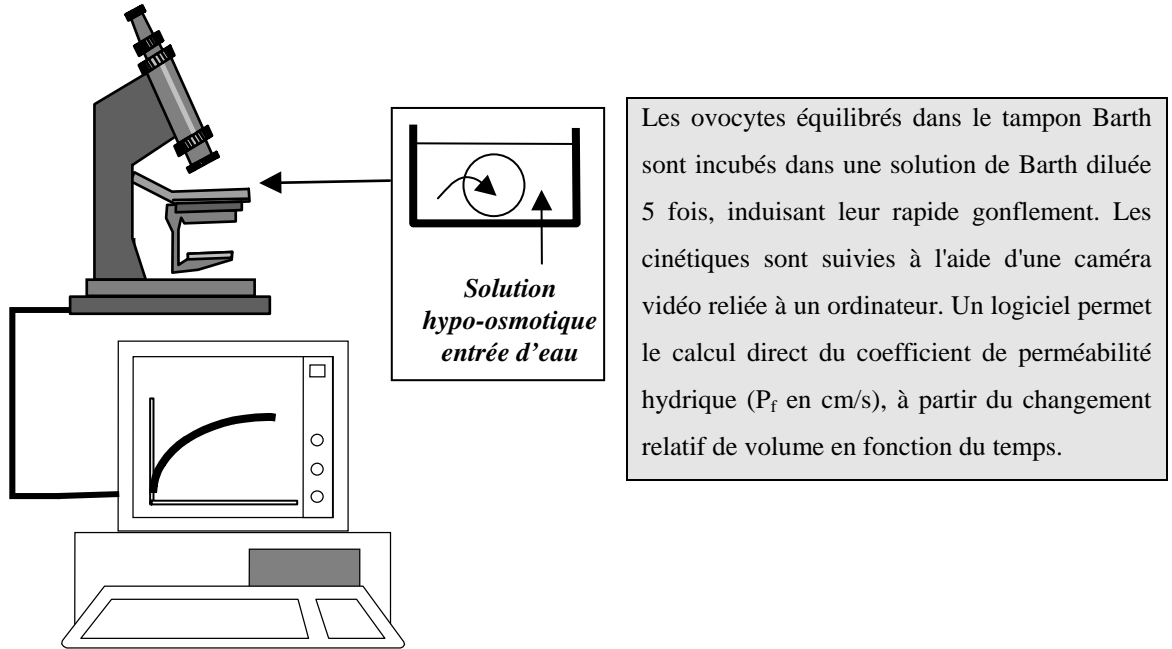
Trois jours après l'injection, les ovocytes sont fixés dans une solution d'OR2 contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) pendant 1 heure, rincés, déshydratés avec une solution de 30% de saccharose dans l'OR2, et congelés à l'azote liquide. Des coupes de 4 à 5 μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont bloquées 2 fois 5 minutes avec du PBS/BSA 1% après un rapide rinçage de 3 minutes, elles sont incubées 1 heure avec l'anticorps anti-AQP3 purifié dilué au 1:300 dans PBS/BSA 1%. Après lavages au PBS (2 fois 5 minutes), elles sont incubées pendant une heure avec un deuxième anticorps (1:100) anti-lapin fabriqué chez la chèvre couplé au FITC ou au CY3 dans le PBS/BSA 1%. Les coupes sont de nouveau lavées 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS et montées sous lamelle pour des observations sous un microscope à fluorescence (Olympus).

IV.B.4. Tests fonctionnels

IV.B.4.a Mesure de la perméabilité à l'eau

Comme nous l'avons vu, l'ovocyte de xénope est utilisé comme système d'expression hétérologue. Dans le cas de l'expression de canaux ou transporteurs, les premières mesures fonctionnelles de perméabilité hydrique ont été reportées par Fischbarg et coll. sur le transporteur de glucose, GLUT 1, en 1990 (Fischbarg *et al.*, 1990). La mesure du gonflement des ovocytes en fonction du temps suite à un choc hypoosmotique (Zhang *et al.*, 1990) est suivie par un système de vidéomicroscopie.

Figure IV.11: Schéma d'enregistrement du gonflement des ovocytes



Le calcul du coefficient de perméabilité hydrique P_f en cm/s est fonction de la variation de volume en fonction du temps, $[d(V/V_0)/dt]$ en s^{-1} , de la surface de l'ovocyte (S) en cm^2 , et du volume molaire partiel de l'eau ($V_w = 18 \text{ cm}^3/\text{mole}$) d'après l'équation:

$$P_f = \frac{V_0 \times \left[\frac{d(V/V_0)}{dt} \right]}{(S \times V_w \times \Delta Osm)}$$

avec $\Delta Osm = (Osm_{int} - Osm_{ext})$, Osm_{int} égal à 200 mosm/l ($0,2 \times 10^{-3} \text{ mole/cm}^3$) et Osm_{ext} à 40 mosm/l ($0,04 \times 10^{-3} \text{ mole/cm}^3$).

IV.B.4.b Mesure de la perméabilité au glycérol

La perméabilité aux solutés peut être mesurée par le système de vidéomicroscopie en se mettant en condition iso-osmotique, c'est à dire avec une solution externe qui comporte du Barth dilué 5 fois (40 mosm/l) auquel a été rajouté 160 mM de glycérol. Comme dans le cas du spectrophotomètre à flux interrompu, la mesure de la perméabilité aux solutés n'est pas une mesure directe puisque l'on suit le flux d'eau concomitant. La méthode la plus fiable consiste donc à mesurer la vitesse de ce transport grâce aux mesures de vitesse d'entrée d'un soluté radioactif dans l'ovocyte.

Les ovocytes équilibrés dans la solution de Barth sont incubés sous agitation douce dans une solution de glycérol (concentrations variables suivant les expériences) marqué au carbone 14, 5 $\mu\text{Ci/ml}$ (provenant du Service des Molécules Marquées du CEA de Saclay), et dans des conditions isotoniques. Au bout d'un temps t (variable suivant les expériences), 3 ml de Barth à 0°C est ajouté. L'ovocyte est récupéré, mis sur un filtre GF/F (Wathman) posé sur une fiole reliée à un système de filtration sous vide, puis il est rincé deux fois avec 3 ml de Barth froid. Le filtre et l'ovocyte sont placés dans une fiole de verre. La radioactivité restant associée aux ovocytes est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation après lyse des ovocytes dans 2% de SDS.

Après soustraction du bruit de fond, les valeurs de cpm mesurées sont transformées en nmoles de glycérol entrées dans l'ovocyte grâce à la relation:

$$P_{gly}(pmol/ovocyte) = \frac{cpm}{STD} \times 10^9 \times [glycérol]$$

avec STD, la moyenne des solutions standard en cpm/ml et [glycérol], la concentration de glycérol en mmol/ml, et 10^9 , le coefficient de conversion des mmoles en pmoles. Si l'incubation dans le glycérol a duré pendant un temps t (min), alors P'_{gly} (pmol/ovocyte/min) = P_{gly}/t .

On peut aussi calculer la perméabilité au glycérol en cm/s qui est égale à $P_{gly}/(S/t')$ où S est la surface de l'ovocyte qui est égale à environ 0,045 cm² pour un gros ovocyte et à 0,023 cm² pour un petit, et t' est le temps en secondes. Pour les chimères, la P_{gly} a été mesurée avec 1 mM de ¹⁴C-glycérol. L'incubation a été de 10 minutes dans le glycérol pour les expériences avec les chimères Cter et de 5 minutes pour les expériences réalisées avec les chimères NPA'. Les valeurs de P_{gly} calculées en nmoles/ovocyte/minute sont donc inférieures pour les expériences dont l'incubation a été de 10 minutes par rapport à celles dont l'incubation était de 5 minutes puisque la vitesse d'entrée du glycérol ralentit à partir de 5 minutes d'incubation.

IV.B.4.c Mesure des coefficients de réflexion pour différents solutés

Les flux d'eau à travers AQP3 exprimée dans l'ovocyte de xénope ont été mesurés en conditions iso-osmotique avec des solutions externes de 160 mM d'éthylène-glycol (C2), de glycérol (C3), de diéthylène-glycol (C4), de xylitol (C5) ou de mannitol (C6) contenus dans du Barth 1/5^{ème} à 40 mosm/l. Les ovocytes sont transférés dans la solution iso-osmotique contenant 160 mM de solutés. Les changements de volume sont suivis par le système de vidéomicroscopie décrit précédemment.

Les mesures de sigma correspondantes pour chaque soluté sont calculées par le rapport du flux d'eau observé en présence du composé imperméant (mannitol) sur celui observé en présence du soluté voulu selon l'équation:

$$\sigma_{soluté} = \frac{[d(V/V_0)/dt]_{soluté}}{[d(V/V_0)/dt]_{mannitol}}$$

IV.C. RESULTATS

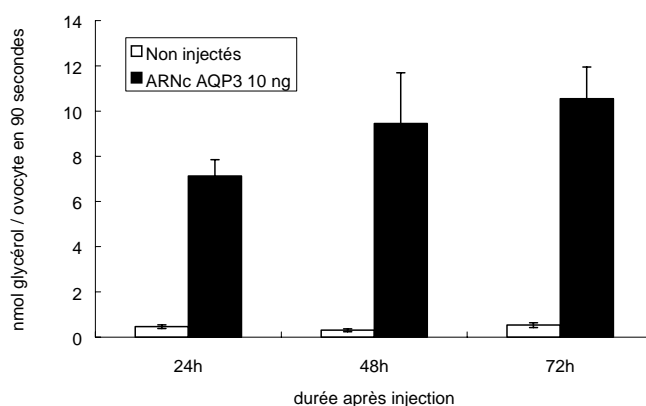
Nous avons tout d'abord établi les conditions nécessaires à l'observation des perméabilités au glycérol d'AQP3 et des chimères exprimées dans l'ovocyte de xénope: la quantité d'ARNc injecté, le temps d'incubation des ovocytes dans le glycérol, la concentration de glycérol, afin de rester dans des conditions de vitesse initiale.

IV.C.1. Etudes préliminaires sur des ovocytes exprimant AQP3

Moment de l'expérience après injection d'ARNc AQP3

Le graphe ci-dessous montre que l'expression d'AQP3 a déjà lieu 24 heures après l'injection de l'ARNc. Si l'on attend 72 heures, l'expression est encore plus élevée.

Figure IV.12: *Effet du temps d'attente entre l'injection et le transport de glycérol.*

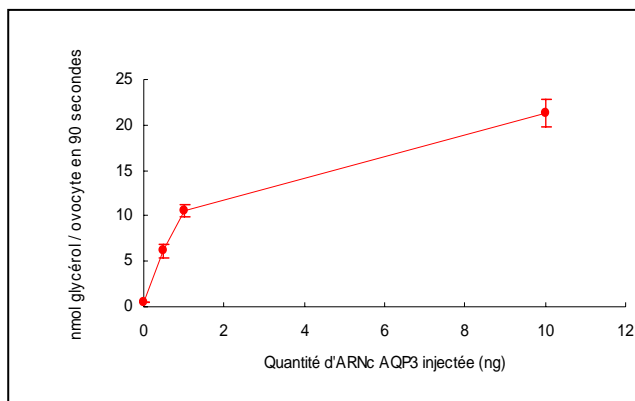


Les ovocytes injectés avec 10 ng d'ARNc AQP3 sont incubés avec du glycérol (160 mM) marqué au ^{14}C pendant 90 secondes et la radioactivité restant dans les ovocytes est comptée.

Quantité d'ARN AQP3 injecté dans les ovocytes de xénope

Différentes quantités d'ARNc AQP3 ont été injectées dans les ovocytes de xénope afin de vérifier un effet de saturation.

Figure IV.13: *Effet de la quantité d'ARNc AQP3 sur le transport de glycérol*

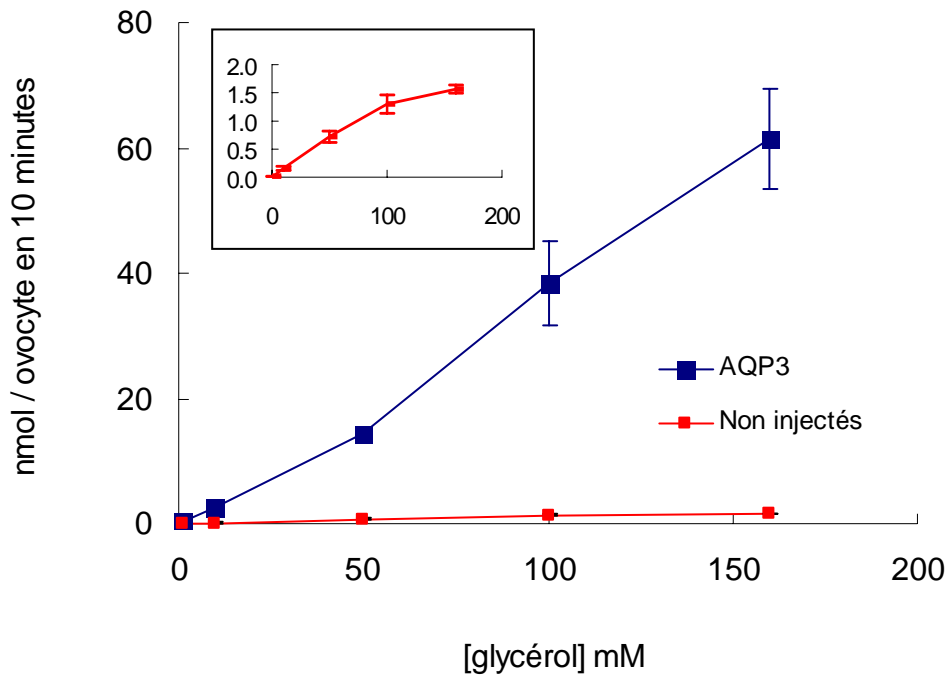


Des quantités de 0 à 10 ng d'ARNc d'AQP3 de rat ont été injectées et la perméabilité au glycérol 160 mM en conditions iso-osmotiques a été mesurée après 90 secondes d'incubation.

On observe un effet saturable de la quantité d'ARNc injectée. Cependant, le plateau n'est pas encore atteint avec 10 ng d'ARNc injectés. Dans la suite des expériences, nous injecterons 10 ng d'ARNc d'AQP3, d'AQP2 et de chimères AQP2-AQP3.

Concentration de glycérol et notion de K_m

Figure IV.14: Effet de la concentration en glycérol sur la perméabilité des ovocytes



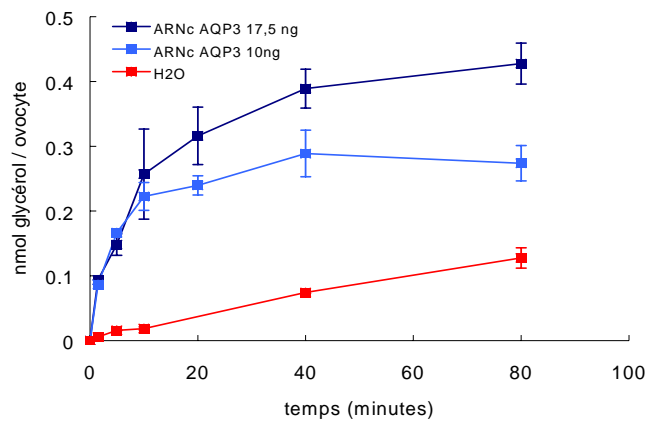
Des ovocytes non injectés ou injectés avec 10 ng d'AQP3 sont incubés en conditions iso-osmotiques avec des concentrations en glycérol allant de 1 mM à 160 mM pendant 10 minutes. Encadré: ovocytes non injectés.

Dans ces gammes de concentrations, la perméabilité au glycérol des ovocytes injectés exprimant AQP3 varie linéairement avec la concentration en glycérol utilisée, indiquant un effet non saturable au niveau du passage de glycérol, suggérant un passage par un canal et non par un transporteur. En revanche, la voie de passage du glycérol dans l'ovocyte de xénope témoin est saturable avec un K_m d'environ 50 mM, en accord avec Maurel *et al.* (Maurel *et al.*, 1994).

Temps d'incubation des ovocytes dans 1 mM de glycérol

Nous avons effectué des cinétiques d'entrée de glycérol avec une concentration de 1 mM de glycérol. Les résultats montrent qu'une différence est observable avec une telle concentration entre les ovocytes exprimant AQP3 et les ovocytes non injectés quel que soit le temps d'incubation utilisé (entre 1,5 à 80 minutes).

Figure IV.15: *Cinétique d'entrée de glycérol*



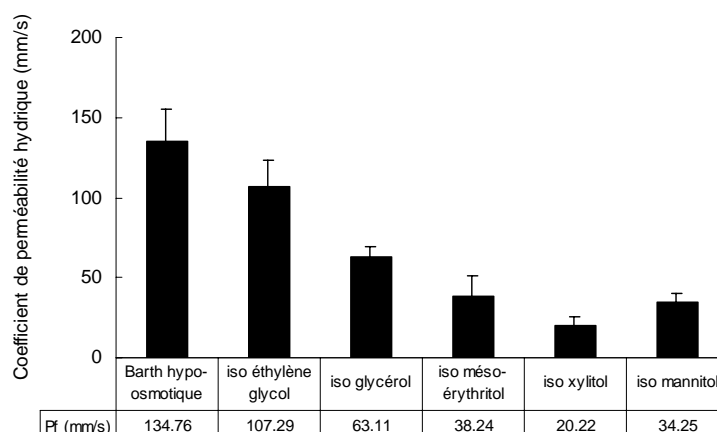
Des ovocytes non injectés ou injectés avec 10 ou 17,5 ng d'ARNc AQP3 sont incubés dans 1 mM de glycérol pendant différentes durées.

Ces résultats montrent que la quantité de glycérol entrée dans les ovocytes exprimant AQP3 est linéaire en fonction du temps et maximum jusqu'à 5 minutes d'incubation environ, mais qu'au delà de ce temps, la vitesse d'influx ralentit.

IV.C.2. Détermination du coefficient de réflexion pour AQP3 exprimée dans l'ovocyte de xénope pour quelques solutés

Nous avons mesuré les coefficients de réflexion à l'aide de solutés de tailles différentes pour AQP3 exprimée dans l'ovocyte de xénope. Les flux d'eau obtenus ont été mesurés à l'aide du système de vidéomicroscopie. Ils donnent les résultats suivants:

Figure IV.16: Mesure des coefficients de réflexion pour quelques solutés



Les ovocytes exprimant AQP3 sont soumis à un gradient hyperosmotique de 160 mM à l'aide des solutés décrits dans le tableau. Les valeurs de σ ont été mesurées par le rapport de la P_f obtenue avec le mannitol (34,25 mm/s), considéré comme imperméant, sur la P_f obtenue avec le soluté. La valeur de P_f obtenue avec l'iso-xylitol est inférieure à celle obtenue avec le mannitol et ne nous a pas permis de calculer une valeur de σ pour ce soluté.

Les valeurs de sigma obtenues pour les solutés choisis sont les suivantes:

éthylène glycol: $\approx 0,32$

glycérol: $\approx 0,54$

méso-érythritol: $\approx 0,89$

Le canal ne laisserait pas passer les molécules à plus de 4 carbones. Ces valeurs indiquent que ces solutés et l'eau sont en interaction à l'intérieur du pore. En revanche, nos valeurs sont plus élevées que celles citées précédemment (Meinild *et al.*, 1998b; Zeuthen et Klaerke, 1999). (Tsukaguchi *et al.*, 1998) qui n'observent qu'une très faible discrimination entre l'eau et le glycérol pour des ovocytes exprimant AQP3.

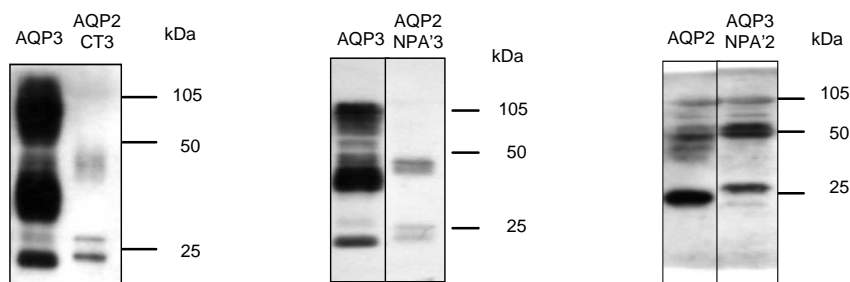
IV.C.3. Etude des chimères dans les ovocytes de xénope

IV.C.3.a Détection de l'expression des chimères

Immunoblot:

Nous avons vérifié l'expression des chimères dans les ovocytes puisqu'il est connu que certains mutants de canaux hydriques ne sont pas exprimés dans l'ovocyte. Les immunoblots obtenus sont représentés sur la figure ci-dessous.

Figure IV.17: Analyse de la présence des chimères dans les membranes d'ovocytes de xénope



Les protéines possédant l'extrémité C-terminale d'AQP3 ont été révélées avec l'anticorps anti-AQP3 dirigé contre la séquence C-terminale de l'AQP3 de rat (AQP3, AQP2-CT3 et AQP2-NPA'3). L'anticorps dirigé contre la séquence C-terminale d'AQP2 de rat a été utilisé pour révéler la présence d'AQP2 et de la chimère AQP3-NPA'2.

Les résultats montrent une expression des chimères dans les membranes d'ovocytes.

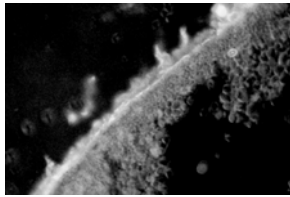
Cependant, les signaux observés pour les chimères possédant les séquences C-terminale d'AQP3 ne sont pas aussi intenses que ceux observés dans les ovocytes exprimant les protéines sauvages AQP3, alors que la même quantité de protéines a été chargée sur le gel, c'est à dire 10 µg (provenant d'un mélange de plusieurs ovocytes ayant exprimé la même protéine). Ceci indique une expression plus faible des protéines mutées par rapport aux protéines sauvages. La chimère AQP3-AQP2 Cter n'a pas été déposée puisque, comme nous le verrons plus loin, sa fonction de transport de glycérol non altérée montre qu'elle est bien exprimée.

Immunofluorescence:

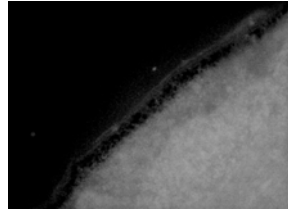
Les résultats précédents ne nous disent pas si les protéines sont bien exprimées à la membrane plasmique des ovocytes et nous avons donc vérifié leur présence par immunofluorescence pour les chimères repérables avec l'anticorps anti-AQP3. Les essais de marquage avec l'anticorps anti-AQP2 ne nous ont pas donné de résultats concluants au niveau de la spécificité de cet anticorps puisqu'il marquait également les membranes d'ovocytes non injectés.

Figure IV.18: Immunofluorescence sur un ovocyte AQP2-AQP3 Cter

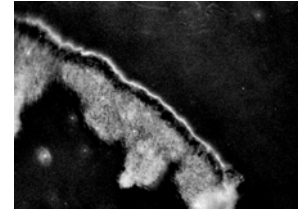
AQP2-CT3
(Ac AQP3-CY3)



AQP3
(aucun-CY3)



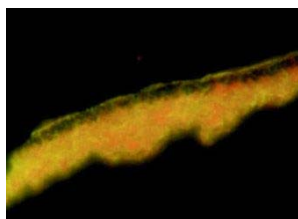
AQP3
(Ac AQP3-CY3)



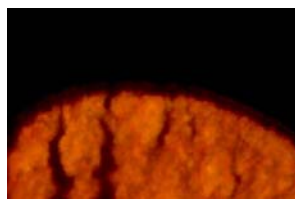
Les marquages ont été effectués avec le 1^{er} anticorps anti-AQP3 puis le 2^{ème} anticorps est couplé au CY3 (sauf au milieu où le 1^{er} anticorps n'a pas été mis, contrôle négatif). A gauche est représentée la chimère AQP2 possédant l'extrémité C-terminale d'AQP3, au milieu et à droite (contrôle positif), les ovocytes expriment AQP3.

Figure IV.19: Immunofluorescence sur un ovocyte AQP2-NPA' AQP3

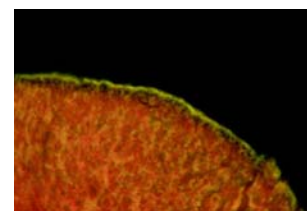
AQP2-NPA'3
(Ac AQP3-FITC)



AQP2
(Ac AQP3-FITC)



AQP3
(Ac AQP3-FITC)



Les marquages ont été réalisés avec le 1^{er} anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale d'AQP3 puis par un 2^{ème} anticorps couplé au FITC. A gauche, l'ovocyte exprime la chimère AQP2-NPA' AQP3 (AQP2-NPA'3), au milieu et à droite, les ovocytes ont été injectés avec de l'ARNc codant pour AQP2 et AQP3, respectivement.

Les résultats montrent que les chimères testées sont bien adressées à la membrane plasmique de l'ovocyte. Les signaux paraissent cependant plus faibles avec les chimères AQP2-NPA' AQP3 et AQP2-AQP3 Cter qu'avec l'AQP3 sauvage, en accord avec les immunblots.

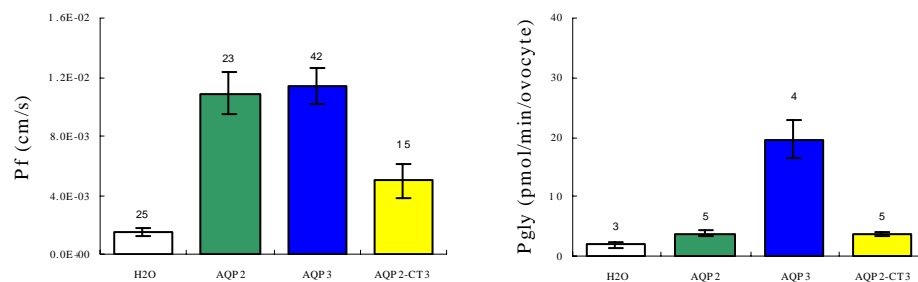
Les chimères étant bien exprimées dans les membranes de l'ovocyte et dans la membrane plasmique pour celles qui ont pu être testées, nous avons mesuré leur perméabilité à l'eau et au glycérol.

IV.C.3.b Mesure des perméabilités à l'eau et au glycérol des chimères

Chimère AQP2-AQP3-Cter

Cette chimère possède une perméabilité à l'eau réduite d'un facteur 2 par rapport aux protéines sauvages AQP2 et AQP3 (figure ci-dessous).

Figure IV.20: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP2-AQP3 Cter



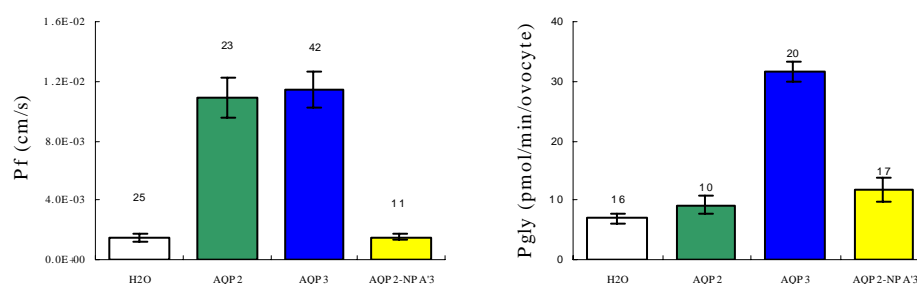
La perméabilité hydrique est mesurée par le système de vidéomicroscopie en transférant les ovocytes équilibrés dans du Barth 1 X vers une solution de Barth 1/5^{ème}. La perméabilité au glycérol est mesurée en incubant les ovocytes dans du ¹⁴C-glycérol 1 mM pendant 10 minutes.

La majorité de la chimère étant constituée d'AQP2, il est compréhensible de ne pas observer de perméabilité au glycérol à travers celle-ci, et le remplacement de la séquence cytoplasmique C-terminale d'AQP2 par celle d'AQP3 ne suffit pas à rendre la protéine perméable au glycérol. Cependant, cette diminution d'un facteur 2 de la P_f peut provenir d'une diminution de l'expression à la membrane plasmique observée en immunoblot et en immunofluorescence, et dans ce cas, la chimère est fonctionnelle puisque l'on sait que la perméabilité hydrique globale de l'ovocyte est proportionnelle à la quantité de canaux présents sur la surface de l'ovocyte.

Chimère AQP2-NPA' AQP3

Comme pour la chimère précédente, la perméabilité à l'eau est diminuée, et même plus fortement que la précédente.

Figure IV.21: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP2 NPA' AQP3



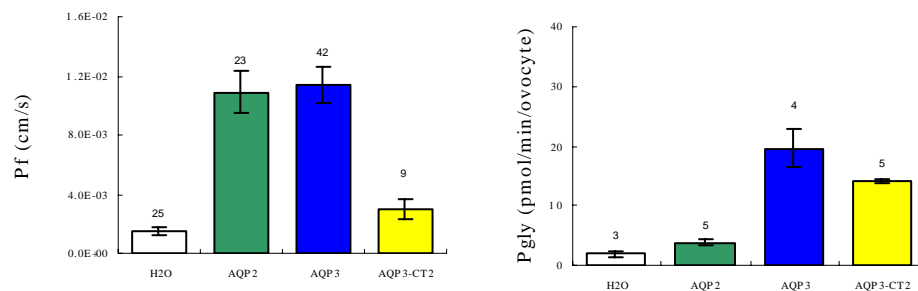
La perméabilité hydrique est mesurée par le système de vidéomicroscopie en transférant les ovocytes équilibrés dans du Barth 1 X vers une solution de Barth 1/5^{ème}. La perméabilité au glycérol est mesurée en incubant les ovocytes dans du ¹⁴C-glycérol 1 mM pendant 5 minutes.

La perméabilité au glycérol n'est pas non plus obtenue après le remplacement d'une séquence plus importante appartenant à AQP3. Notons que les cinétiques d'entrée de glycérol sont plus rapides que dans l'expérience précédente car elles ont été obtenues avec un temps d'incubation de 5 minutes au lieu de 10 minutes (à partir de 5 minutes, la vitesse du flux ralentit).

Chimère AQP3-AQP2 Cter

Cette chimère présente également un défaut dans sa fonction de transport hydrique mais la perméabilité hydrique mesurée est légèrement supérieure à celle des ovocytes témoins. On pourrait penser que ce défaut fonctionnel est aussi dû à une diminution de l'expression à la membrane plasmique, mais la perméabilité au glycérol n'est pas altérée par le remplacement de la séquence C-terminale d'AQP3 par celle d'AQP2, indiquant que cette chimère est bien exprimée à la membrane plasmique de l'ovocyte.

Figure IV.22: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP3-AQP2 Cter



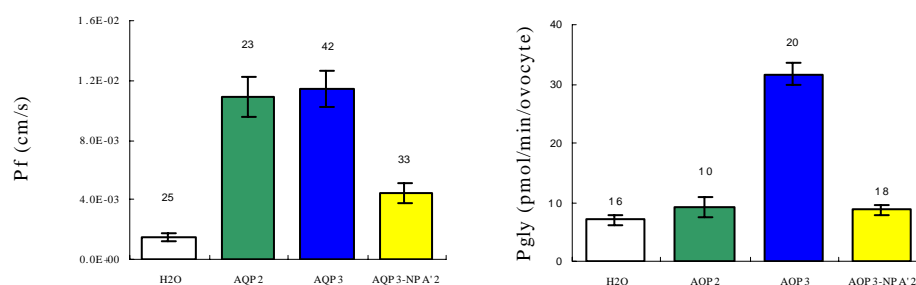
La perméabilité hydrique est mesurée par le système de vidéomicroscopie en transférant les ovocytes équilibrés dans du Barth 1 X vers une solution de Barth 1/5^{ème}. La perméabilité au glycérol est mesurée en incubant les ovocytes dans du ¹⁴C-glycérol 1 mM pendant 10 minutes.

Ce résultat pourrait suggérer que la séquence C-terminale d'AQP3 est impliquée dans la fonction de transport hydrique et qu'elle est spécifique de chaque protéine, puisque la séquence C-terminale d'AQP2 ne la remplace pas, indiquant qu'elle pourrait interagir avec d'autres parties de la protéine pour former le pore hydrique. En revanche, cette séquence C-terminale d'AQP3 n'interviendrait pas dans la fonction de transport de glycérol.

Chimère AQP3-NPA' AQP2

Les résultats ci-dessous montrent que cette chimère présente aussi une diminution de la perméabilité hydrique qui est cependant plus élevée que celle des ovocytes témoins. Cette chimère présente également une diminution de la perméabilité au glycérol.

Figure IV.23: Perméabilité à l'eau et au glycérol de AQP3 NPA' AQP2



La perméabilité hydrique est mesurée par le système de vidéomicroscopie en transférant les ovocytes équilibrés dans du Barth 1 X vers une solution de Barth 1/5^{ème}. La perméabilité au glycérol est mesurée en incubant les ovocytes dans du ¹⁴C-glycérol 1 mM pendant 5 minutes.

Nous ne disposons que de l'immunoblot et nous n'avons hélas pas pu vérifier si cette chimère était bien exprimée à la membrane plasmique. Nous ne pouvons donc conclure avec certitude que la partie située entre le 2^{ème} motif NPA et la fin du 6^{ème} domaine transmembranaire est impliquée dans la fonction de transport de glycérol.

IV.C.4. Coexpression des chimères AQP2-NPA' AQP3 et AQP3-NPA' AQP2

Puisque les résultats précédents semblent indiquer une baisse de la fonction ou de l'expression à la membrane plasmique des chimères AQP2-NPA' AQP3 et AQP3-NPA-AQP2, nous avons supposé que la coinjection des chimères complémentaires présentant une inversion de séquences à partir du 2^{ème} motif NPA dans les ovocytes de xénope induirait peut-être la formation d'un tétramère hétérologue pouvant être mieux exprimé ou pouvant restaurer un canal fonctionnel pour le transport d'eau et/ou de glycérol.

Nous avons mesuré les perméabilités à l'eau et au glycérol d'ovocytes injectés avec de l'eau, avec AQP2, avec AQP3, avec les chimères séparément ou avec les chimères coinjectées. Les expériences ont été réalisées sur 4 lots d'ovocytes différents dans les mêmes conditions. Les 4 expériences nous ont donné des résultats différents deux à deux.

Perméabilité au glycérol des ovocytes coinjectés

L'observation des résultats de la perméabilité au glycérol des ovocytes coinjectés nous a laissés perplexes dans un premier temps puisque sur les 4 expériences réalisées, deux expériences ont montré une perméabilité au glycérol aussi élevée que les ovocytes exprimant AQP3 (lot A) et deux autres expériences ont montré une P_{gly} équivalente à celle des ovocytes témoins injectés à l'eau (lot B).

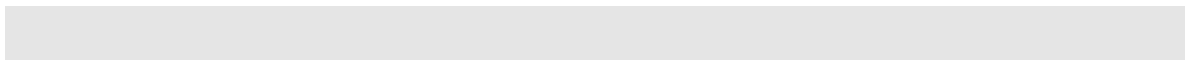
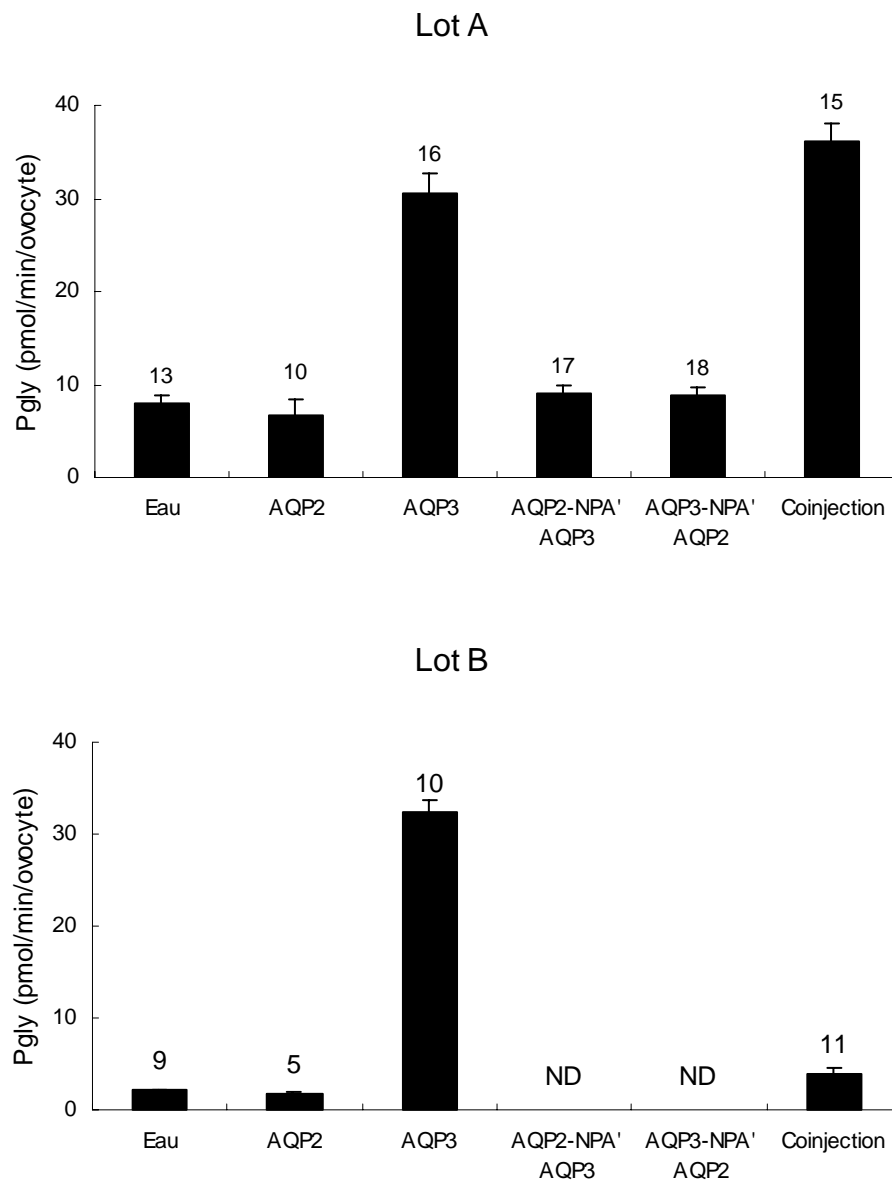


Figure IV.24: Perméabilité au glycérol des ovocytes coinjectés



La perméabilité au glycérol a été mesurée sur des ovocytes injectés avec 50 nl d'eau ou 10 ng d'ARNc. Pour la coinjection, les ovocytes ont été injectés avec 5 ng d'ARN codant pour AQP2-NPA' AQP3 et 5 ng d'ARNc codant pour AQP3-NPA' AQP2. Les expériences ont été répétées 4 fois sur 4 lots d'ovocytes différents. Les ovocytes ont été incubés dans 200 μ l de 14 C-glycérol 1 mM pendant 5 minutes avant rinçage. Les résultats ont été regroupés en deux lots après observation de la perméabilité au glycérol de base des ovocytes (injectés à l'eau).

Nous ne savons pas si la perméabilité au glycérol observée avec les ovocytes coinjectés avec les chimères complémentaires inversées à partir du deuxième motif NPA vient de la formation d'une voie de passage pour le glycérol par les deux chimères associées, ou bien d'une association de ces chimères par hétéromérisation avec un facilitateur endogène, ou encore de l'induction d'un facilitateur de glycérol endogène de l'ovocyte de xénope. En regardant les valeurs de base de P_{gly} pour les ovocytes injectés à l'eau ou avec AQP2, on s'aperçoit qu'elles sont environ 3 à 4 fois plus élevées dans le lot A que dans le lot B. Les ovocytes injectés séparément avec les chimères (lot A) présentent une perméabilité au glycérol au niveau de celle des ovocytes témoins de ce même lot. Notre hypothèse serait plutôt l'induction de l'expression à la membrane plasmique d'un facilitateur de glycérol endogène des ovocytes de xénope du lot A, par association avec les chimères ou non.

Perméabilité à l'eau des ovocytes coinjectés.

La perméabilité à l'eau a également été mesurée sur les 4 lots d'ovocytes, le jour même où les mesures de P_{gly} ont été effectuées. Les résultats sont aussi regroupés par lots (A et B précédemment définis).

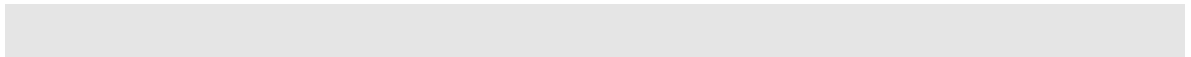
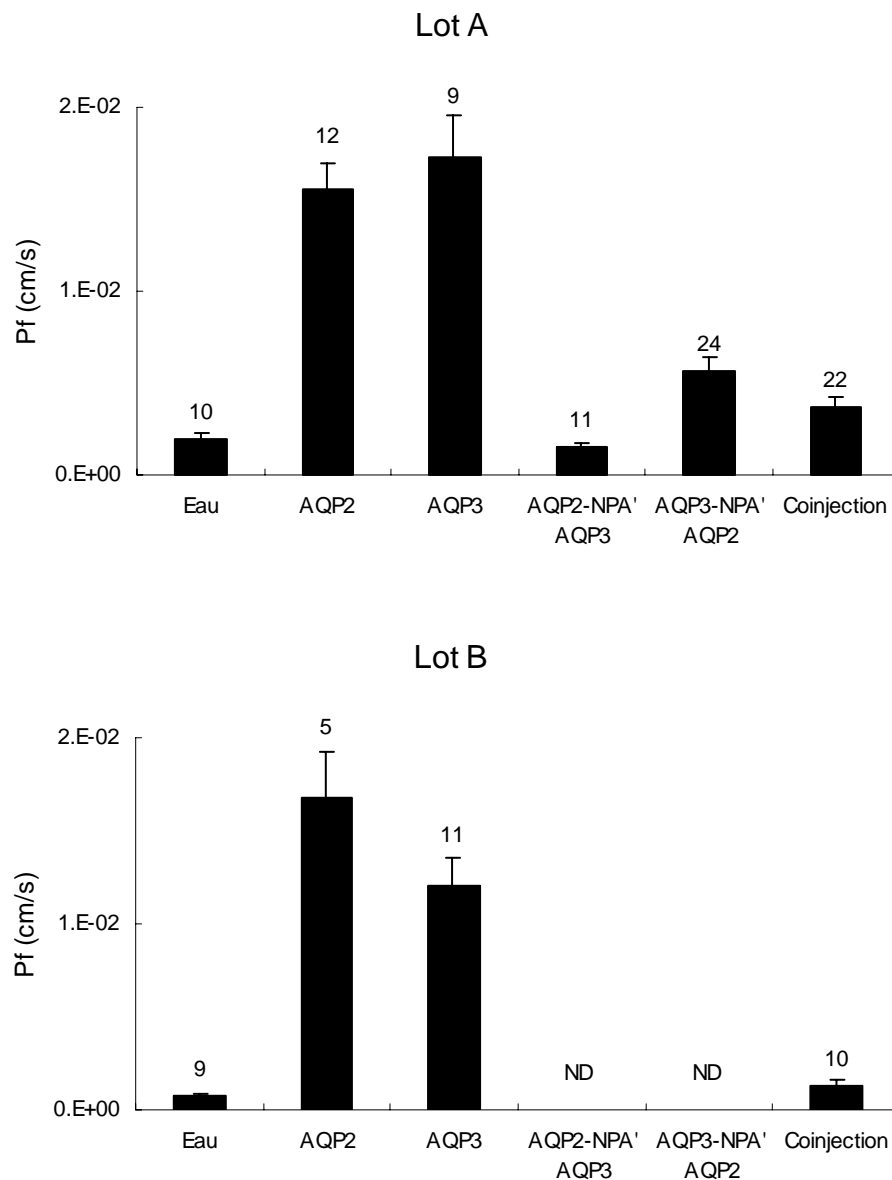


Figure IV.25: Perméabilité à l'eau des ovocytes coinjectés



La perméabilité à l'eau a été mesurée sur des ovocytes injectés avec 50 nl d'eau ou 10 ng d'ARN. Pour la coinjection, les ovocytes ont été injectés avec 5 ng d'ARNc codant pour AQP2-NPA' AQP3 et 5 ng d'ARNc codant pour AQP3-NPA' AQP2. Les expériences ont été répétées 4 fois sur 4 lots d'ovocytes différents. Les résultats ont été regroupés en deux lots après observation de la perméabilité hydrique de base des ovocytes (injectés à l'eau). L'injection des chimères seules n'avait été faite que dans deux expériences.

Même si la perméabilité hydrique des ovocytes exprimant AQP3 est plus basse dans le lot B par rapport au lot A, elle n'est pas significativement différente de celle des ovocytes injectés avec AQP2 du lot B. On remarque encore que la P_f de base des ovocytes injectés à l'eau du lot A est plus élevée que celle des ovocytes du lot B. Cette différence se reflète aussi avec les ovocytes coinjectés.

IV.C.5. Etude des P_f et P_{gly} d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation

Nous avons vu dans les travaux précédents que le système d'expression hétérologue choisi n'est pas sans présenter quelques inconvénients. En effet, les ovocytes de xénope ne sont pas homogènes d'un animal à l'autre et même dans un même animal, ils sont présents à des stades de maturation différents. Ainsi, il a été montré que l'injection de certains ARNs pouvait produire une augmentation de perméabilité à l'eau et au glycérol de la membrane de l'ovocyte qui ne provient pas forcément de la protéine que l'on a voulu surexprimer mais au contraire, de l'expression induite d'une protéine endogène (Schreiber *et al.*, 1997). Récemment, il a été observé une activation des perméabilités à l'eau et au glycérol dans les épithéliums pulmonaires et les cellules CHO, qui sont dépendantes de la CFTR (Schreiber *et al.*, 1999), la CFTR n'étant pas perméable à l'eau, contrairement à ce que certains auteurs avaient démontré (Hasegawa *et al.*, 1992).

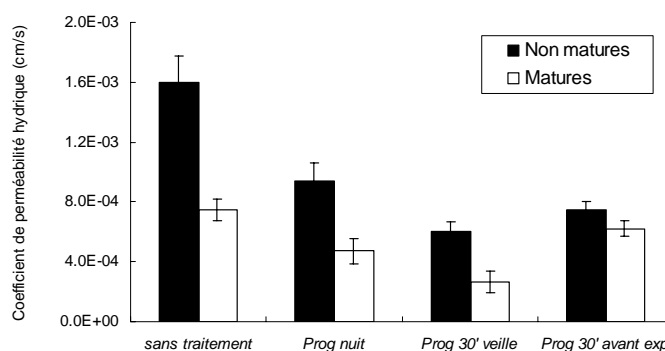
D'autre part, les travaux de l'équipe argentine (Ford *et al.*, 1996) ont montré que l'injection d'ARNm provenant d'ovocytes de crapaud *Bufo arenarum* dans les ovocytes de *Xenopus laevis* augmente la perméabilité hydrique de ces derniers. Si les ovocytes de crapaud sont prétraités à la progestérone, alors, les ARNm issus de ces ovocytes n'induisent plus l'expression de canaux hydriques à la membrane des ovocytes de xénope dans lesquels ont été injectés ces ARNm. Il a été également montré que l'AQP9 de rat était exprimée dans les ovocytes de rat non matures mais qu'elle était absente dans les ovocytes se trouvant dans un stade de maturation avancé (parisi, 1999). On pourrait imaginer qu'un phénomène équivalent a lieu dans les ovocytes de xénope et c'est ce que nous avons cherché à éclaircir.

Il nous a donc paru incontournable de mesurer la perméabilité à l'eau et au glycérol d'ovocytes témoins à différents stades de maturation.

IV.C.5.a Perméabilité hydrique d'ovocytes à différents stades de maturation

Le graphe ci-dessous montre une différence dans la perméabilité hydrique des ovocytes suivant leur stade de maturation: la P_f des ovocytes non matures est environ 2 fois plus importante que celle des ovocytes matures.

Figure IV.26: P_f d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation et effet de la progestérone



Les ovocytes matures ou non matures, incubés ou non avec la progestérone, 5 μ g/ml, (toute la nuit, 30 minutes la veille, ou 30 minutes juste avant l'expérience) sont soumis à un choc hypo-osmotique. (Barres d'erreur = déviation standard, Chaque barre représente la valeur moyennée de 2 à 4 expériences effectuées chacune avec environ 5 ovocytes)

La progestérone est une hormone stéroïdienne qui induit la maturation des ovocytes de xénope. Nous avons testé l'effet de la progestérone à divers moments avant l'expérience de transport (la veille ou juste avant) et pendant un temps d'incubation variable (toute la nuit ou pendant 30 minutes), aussi bien sur les ovocytes matures que sur les ovocytes non matures.

Les ovocytes non matures qui ont été rendus matures grâce à l'incubation dans la progestérone ont une P_f inférieure aux ovocytes non traités, quels que soient la durée ou le

moment de l'incubation. L'effet est obtenu à court terme (30 minutes juste avant l'expérience) ou à long terme (30 minutes la veille). Les ovocytes matures sont encore sensibles à la progestérone, indiquant que même les ovocytes considérés matures, ne le sont pas complètement. Dans ces ovocytes, l'effet obtenu est un effet à long terme car l'incubation des ovocytes "matures" 30 minutes avant l'expérience ne suffit pas à obtenir une P_f aussi basse que celle obtenue avec une incubation dans la progestérone de 30 minutes la veille.

IV.C.5.b Perméabilité au glycérol d'ovocytes à différents stades de maturation

La figure ci-dessous montre également une perméabilité au glycérol plus faible dans les ovocytes non matures par rapport aux ovocytes matures. Dans le cas des ovocytes non matures, l'action de la progestérone a un effet plus puissant si elle agit toute la nuit que si elle agit 30 minutes seulement, soit la veille, soit juste avant l'expérience. Sur les ovocytes matures, l'action est aussi plus efficace toute la nuit, mais également la veille pendant 30 minutes. Elle n'a pratiquement plus d'effet si elle est ajoutée pendant 30 minutes juste avant l'expérience.

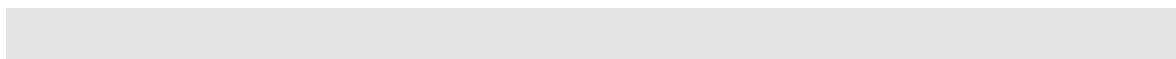
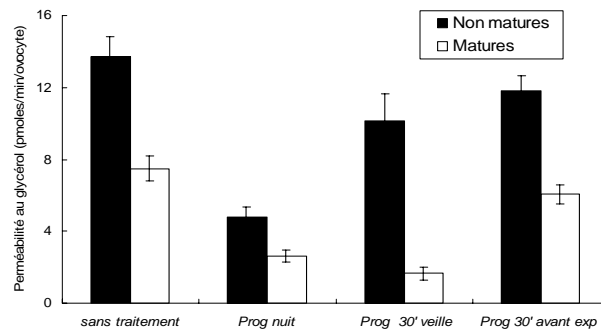


Figure IV.27: P_{gly} d'ovocytes de xénope à divers stades de maturation et effet de la progestérone



Les ovocytes matures ou non matures, incubés ou non avec la progestérone, 5 $\mu\text{g/ml}$, (toute la nuit, 30 minutes la veille, ou 30 minutes juste avant l'expérience) sont incubés 5 minutes avec une solution de ^{14}C -glycérol 1 mM. La radioactivité restante dans chaque ovocyte est comptée. (Barres d'erreur = déviation standard, Chaque barre représente la valeur moyennée de 2 à 4 expériences effectuées chacune avec environ 5 ovocytes).

Ces résultats montrent donc qu'une perméabilité au glycérol plus importante est présente dans les ovocytes non matures par rapport aux ovocytes matures et que dans les deux cas, elle est encore diminuée après traitement à la progestérone.

L'ovocyte d'amphibien est arrêté en stade prophase I de la méiose et reste dans ce stade jusqu'à ce qu'il rencontre la progestérone (Masui et Clarke, 1979). La progestérone déclenche alors la méiose et les ovocytes s'arrêtent en métaphase II jusqu'à ce qu'ils soient fécondés. Des travaux de cryofracture sur les ovocytes de xénope ont montré qu'après 5 minutes de traitement à la progestérone, il est observé une diminution de la quantité de particules intramembranaires à la surface de la membrane plasmique (Bluemink *et al.*, 1983) ainsi qu'une augmentation des vésicules dans le cortex de l'ovocyte (Larabell et Chandler, 1988). La revue de Maller et Krebs montre l'existence de régulations importantes dans les ovocytes en cours de maturation (Maller et Krebs, 1980).

Il avait depuis longtemps été montré que la progestérone induisait un changement de la perméabilité membranaire des ovocytes de xénope, en particulier aux acides aminés (Pennequin *et al.*, 1975). Il a également été décrit une diminution de la perméabilité à l'urée de la membrane de l'ovocyte de grenouille *Rana pipiens* (Lau *et al.*, 1994). Nous avons vu d'après nos résultats et d'après les résultats de la littérature, que si les ovocytes de *Xenopus laevis* sont dans un stade de maturation précoce, l'expression d'une protéine exogène pouvait induire l'expression et/ou l'adressage plus importante d'un canal endogène. Grâce aux mesures des perméabilités hydriques et au glycérol d'ovocytes de xénope matures et non matures, nous avons montré que les transports d'eau et de glycérol étaient plus importants dans les ovocytes de xénope non matures que dans les ovocytes en stade de maturation plus avancé. L'action de la progestérone induit une réduction plus importantes de ces perméabilités. Les résultats obtenus sur la coinjection des chimères auraient pu nous amener à penser initialement que la formation d'un tétramère hétérologue entre les deux chimères pouvait former un canal fonctionnel pour le transport du glycérol. Cependant, les résultats n'ont pas été reproduits avec d'autres lots d'ovocytes. Après vérification des perméabilités des ovocytes non injectés, nous en avons conclu que l'artéfact provenait de l'expression à la membrane plasmique de l'ovocyte de la protéine endogène ou bien de l'association en oligomères de la protéine endogène et des chimères exogènes. Ces résultats sont à associer avec ceux déjà obtenus sur l'induction d'un canal endogène de l'ovocyte de xénope par l'expression de la CFTR (Schreiber *et al.*, 1997). Le clonage de ce canal ou de ce transporteur endogène, pourrait nous renseigner sur leur appartenance, ou non, à la famille des protéines MIPs. Des expériences de saturation par des concentrations en glycérol variables pourraient être envisagées pour discriminer entre canal ou transporteur.

IV.D. DISCUSSION-CONCLUSION

Le travail effectué sur les chimères a montré l'implication de certains segments dans les fonctions de transport d'eau et/ou de glycérol des canaux hydriques utilisés.

Les expériences de western-blot et d'immunofluorescence semblent montrer que les protéines chimères sont moins bien exprimées dans les ovocytes et moins bien adressées à la membrane plasmique (pour celles qui ont pu être testées en immunofluorescence), ce qui pourrait expliquer l'absence de fonction pour certaines d'entre elles. Cependant, la perméabilité au glycérol de la chimère AQP2-AQP3 Cter n'est pas altérée, ce qui prouve que la protéine est bien adressée à la membrane plasmique de l'ovocyte et qu'elle a donc bien perdu sa fonction de canal hydrique.

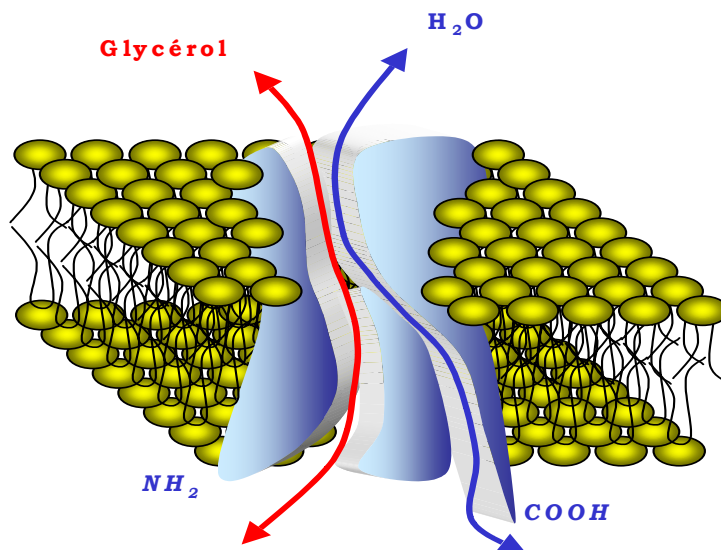
En se basant sur les résultats obtenus sur cette seule chimère AQP3-AQP2 Cter, on peut conclure que la partie C-terminale d'AQP3 est impliquée dans le pore hydrique et que la partie équivalente d'AQP2 insérée à la place ne permet pas de rétablir la fonction de transport hydrique, suggérant une spécificité de cette partie d'AQP3 qui n'est pas interchangeable entre les canaux hydriques. Cette partie C-terminale d'AQP3 pourrait peut-être interagir avec d'autres parties de la molécule pour former un pore hydrique et la partie C-terminale d'AQP2 n'en est pas capable, et pourrait au contraire gêner certaines interactions. D'autre part, cette séquence C-terminale n'est pas impliquée dans la formation du pore du glycérol puisque le transport de glycérol n'est pas altéré dans cette chimère.

En revanche, les transports d'eau et de glycérol sont altérés dans la chimère AQP3-NPA' AQP2 suggérant que la partie comprise entre le deuxième motif NPA et la fin du dernier segment transmembranaire est impliquée dans ces fonctions, sous réserve que ces baisses de fonction ne soient pas dues à une baisse d'expression à la membrane plasmique.

Ces travaux sont en accord avec ceux de l'équipe de Rennes puisque parmi les cinq positions discriminantes entre les aquaporines et les facilitateurs de glycérol, quatre d'entre elles sont situées dans la boucle E et dans le dernier segment transmembranaire (Froger *et al.*, 1998).

Le passage d'eau est altéré dans la chimère AQP3-AQP2 Cter, mais celui du glycérol est intact, suggérant qu'il n'y a pas de voie commune pour ces deux composés. Au contraire, le calcul du coefficient de réflexion inférieur à 1 pour le glycérol à travers AQP3, de même que les travaux de Zeuthen *et al.*; montrant l'effet du pH sur P_f et P_{gly} (Zeuthen et Klaerke, 1999), suggèrent une interaction de ces deux composés à l'intérieur du pore. Il existe également une controverse au niveau des résultats d'inhibition par les mercuriels trouvés par certaines équipes (voir chapitre II.C). Tous ces résultats regroupés m'amènent à penser à un nouveau modèle concernant la voie de passage de l'eau et des solutés: on pourrait supposer qu'une partie seulement des voies de passage de l'eau et du glycérol serait commune. Ce modèle hypothétique, représenté ci-dessous, ne remet pas en cause le modèle du sablier décrit par Jung *et al.* (Jung *et al.*, 1994b) et pourrait tout à fait coïncider.

Figure IV.28: Modèle hypothétique d'AQP3



La voie de passage pour l'eau et le glycérol est commune dans une certaine partie, là où les molécules interagissent ensemble (valeurs de sigma pour le glycérol inférieure à 1). Les voies se sépareraient au niveau du pore avec le passage d'eau situé près de l'extrémité C-terminale cytoplasmique (portion impliquée dans le passage d'eau mais pas dans celui du glycérol: observation faite par les mesures de transport de la chimère AQP3-AQP2 Cter).

Par ailleurs, nous avons coinjecté les deux chimères complémentaires AQP2-NPA' AQP3 et AQP3-NPA' AQP2 dans les ovocytes de xénope afin de tenter de reconstruire un canal fonctionnel par hétéromérisation. Les mesures de perméabilité des ovocytes coinjectés ont montré des résultats opposés suivant les ovocytes utilisés pour les expériences. Dans les expériences où une perméabilité au glycérol aussi élevée que celle des ovocytes exprimant AQP3 a été mesurée dans les ovocytes coinjectés, les ovocytes témoins de cette même expérience montrent des perméabilités de base à l'eau et au glycérol supérieures d'un facteur 3 à 4 par rapport aux ovocytes témoins des autres expériences. Nous avons montré que ces variations de perméabilités de base provenaient du stade de maturation des ovocytes. Cependant, nous n'avons pas déterminé ce qui a pu provoquer cette perméabilité au glycérol élevée dans les ovocytes coinjectés. Il s'agirait peut-être d'une hétéromérisation des chimères entre elles ou avec des sous-unités endogènes des ovocytes de xénope ou de l'induction à la membrane plasmique du canal endogène par les chimères. Ainsi, nous concluons qu'un soin attentif dans le choix des ovocytes doit être apporté pour étudier la fonction de protéines MIP récemment clonées dans le but de s'affranchir des perméabilités provenant de la présence d'une protéine MIP endogène dans les ovocytes de xénope. Le moyen pour y remédier est de vérifier la valeur des perméabilités de base des ovocytes non injectés et de s'assurer qu'elles sont suffisamment faibles pour ne pas suspecter la présence de canaux endogènes.

CHAPITRE V. DETERMINATION DE **L'OLIGOMERISATION D'AQP3 EXPRIMEE DANS** **DIFFERENTS SYSTEMES**

V.A. INTRODUCTION

Parmi toutes les protéines MIP, seule la structure d'AQP1 est connue actuellement à haute résolution (Cheng *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997) pour des raisons déjà citées en introduction. Les résultats ont montré qu'AQP1 était tétramérique. Cette structure avait été observée auparavant par des études de cryofracture sur membranes (Smith et Agre, 1991; Verbavatz *et al.*, 1993; Zeidel *et al.*, 1994). Le rôle de cette oligomérisation n'est pas bien claire puisqu'il a été montré que chaque sous-unité d'AQP1 était fonctionnelle (Preston *et al.*, 1993; Van Hoek *et al.*, 1991), mais elle pourrait stabiliser les monomères. Par des approches biochimiques permettant de déterminer le coefficient de sédimentation de protéines solubilisées dans les détergents non dénaturants, la structure tétramérique d'AQP1 a été confirmée (Jung *et al.*, 1994b; Mathai et Agre, 1999) et il a été montré que d'autres canaux hydriques possédaient également une structure tétramérique, tel AQP2 (Kamsteeg *et al.*, 1999). Cette méthode a servi à démontrer qu'une simple mutation dans les canaux hydriques pouvait empêcher leur oligomérisation (Kamsteeg *et al.*, 1999; Mathai et Agre, 1999). Nous pouvons imaginer que toutes les protéines de la famille MIP doivent avoir une structure tridimensionnelle semblable du fait de leur topologie générale identique, mais la faible identité de séquence de certains segments et la différence de sélectivité observée entre les aquaporines et les aquaglycéroporines pourrait suggérer qu'elles possèdent une structure différente.

Grâce aux calculs des coefficients de sédimentation en conditions non dénaturantes, l'équipe de Rennes a montré la structure tétramérique d'AQPcic et ils ont observé que le facilitateur de *E. coli*, GlpF, sédimentait dans des fractions plus légères. Ils en ont déduit que GlpF avait une structure monomérique dans les membranes (Lagree *et al.*, 1998a). De plus, une double mutation dans AQPcic consistant à insérer les résidus de GlpF correspondant à ces mêmes positions (W203L/Y222P) provoque un changement du coefficient de sédimentation de la protéine AQPcic mutée par rapport à la sauvage, suggérant un passage de l'état tétramérique à l'état monomérique.

Il nous a donc paru intéressant de connaître l'état d'oligomérisation d'une aquaglycéroporine qui n'est pas seulement un canal hydrique strict mais aussi un facilitateur de glycérol. Ceci nous permettrait d'avancer dans la compréhension des propriétés de sélectivité des protéines MIP.

Nous avons donc utilisé l'approche biochimique et la méthode de cryofracture de membranes d'ovocytes pour cette étude. Pour la détermination du coefficient de sédimentation, nous avons utilisé des membranes de divers systèmes natifs ou hétérologues dans lesquels AQP3 était exprimée. Nous avons également choisi un détergent dénaturant, le SDS, qui servira de contrôle pour connaître le coefficient de sédimentation des monomères dans divers détergents non dénaturants, le NLS, l'OG et le Triton X-100. Le choix de plusieurs systèmes et de plusieurs détergents permet de trouver les meilleures conditions de solubilisation pour AQP3. Cette solubilisation dépend effectivement du détergent utilisé et de la composition des lipides environnant la protéine membranaire. Les résultats pourront ainsi être comparés les uns aux autres.

Les systèmes utilisés sont le globule rouge humain et la médullaire externe de rein de rat (natifs), l'ovocyte de xénope et la levure pour les systèmes hétérologues. Le globule rouge possède deux canaux hydriques (AQP1 (Preston et Agre, 1991) et AQP3 (Roudier *et al.*, 1998)). AQP1 est connu pour résider dans les membranes en tétramères et nous servira de contrôle, même si certains auteurs ont montré une forme dimérique après solubilisation en OG (van Hoek *et al.*, 1995).

La comparaison des faces P de cryofracture de membranes d'ovocytes de xénope exprimant des protéines exogènes et de membranes d'ovocytes témoins a permis de

calculer la densité des particules exogènes et d'estimer leur diamètre (Eskandari *et al.*, 1998; Zampighi *et al.*, 1995). Nous avons effectué ce travail sur des ovocytes exprimant AQP3 afin de déterminer les paramètres ci-dessus et d'apporter des résultats supplémentaires pour définir l'état d'oligomérisation de cette aquaglycéroporine.

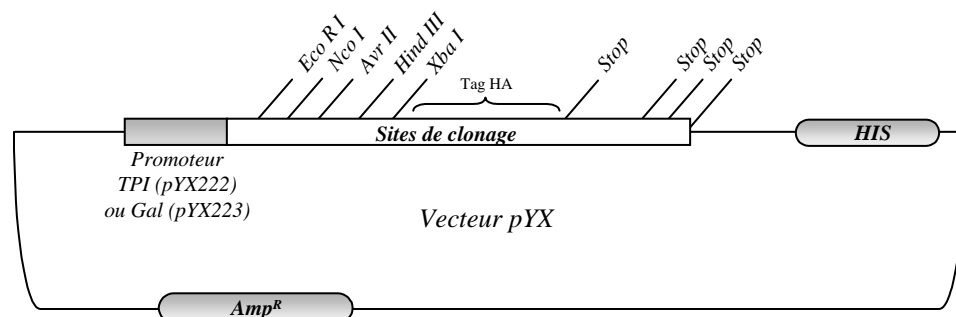
V.B. MATERIELS ET METHODES

V.B.1. Expression d'AQP3 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

V.B.1.a Construction du vecteur portant le gène codant pour AQP3

Le vecteur utilisé pour l'expression d'AQP3 de rat dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* est pYX222. Ce vecteur contient le promoteur de la triose phosphate isomérase qui est un des plus puissants promoteurs constitutifs décrits dans la levure, il permet un niveau d'expression comparable à celui des enzymes les plus abondantes de la levure. Il porte également le marqueur de sélection à l'histidine et le gène de résistance à l'ampicilline.

Figure V.1: Schéma des vecteurs pYX222 et pYX223



Les vecteurs pYX possèdent un marqueur de sélection à l'histidine (HIS), un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) et un promoteur, constitutif dans le vecteur pYX222 (TPI), ou inductible par le galactose (Gal) dans le vecteur pYX223.

L'ORF codant pour l'AQP3 de rat situé dans le site de clonage multiple de pSPORT I entre *Sal* I et *Not* I nous a été fourni par M. Echevarria. Ce vecteur a été partiellement digéré par *Not* I (cohésif avec *Nco* I) situé juste avant le codon ATG du gène AQP3 puis

avec *Hind* III pour isoler la séquence complète de l'AQP3 de rat. Ce fragment a été ensuite cloné dans le vecteur pYX222 digéré par *Nco* I et *Hind* III. Le vecteur pYX223 contenant un promoteur inductible par le galactose a aussi été utilisé.

V.B.1.b Transformation de la souche W303 et W303/*fps1::LEU* et culture des levures

La souche W303-1A (MATa, *ade2-1*, *his3-11,15*, *leu2-3,112*, *trp1-1*, *ura3-1*) de *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée pour la transformation avec le plasmide pYX222 ou pYX223 portant l'ORF d'AQP3 de rat à l'aide d'un électroporateur (BioRad Gene Pulser). Les levures sont mises en culture sur un milieu synthétique contenant 0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base) sans acides aminés avec 2% de glucose, 40 µg/ml adenine, 60 µg/ml L-leucine, 40 µg/ml L-tryptophane, 20 µg/ml uracile et 2% d'agar (Difco). Les levures transformées, sélectionnées par leur aptitude à pousser sur milieu sans histidine, sont mises en culture dans le même milieu liquide (dépourvu d'Agar) à 30°C. La souche W303/*fps1::LEU* possède un gène de synthèse de la leucine (LEU) lui permettant de pousser sur milieu sans leucine. Le fait de transformer cette souche par le vecteur pYX222 ou pYX222/AQP3 lui confère l'aptitude à pousser sur milieu sans histidine. L'absence d'histidine permet la sélection de la souche transformée.

V.B.1.c Test fonctionnel

Les levures sauvages W303 ou disruptées pour le gène codant pour le transporteur de glycérol endogène, Fps1 (Luyten *et al.*, 1994) (W303/*fps1::LEU*), transformées avec le vecteur pYX222, ou avec le vecteur pYX222 contenant l'AQP3 de rat, sont cultivées dans le milieu YNBG liquide jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600} = 1$ (5×10^7 levure/ml). Le culot de levure est resuspendu dans le milieu YNBG à 2×10^8 levures / ml. Les levures sont

incubées dans 1 mM ou 100 mM de glycérol contenant 5 μ Ci/ml de glycérol marqué au C¹⁴.

A différents temps, 500 μ l sont prélevés (10⁸ levures), filtrés sur filtre Whatman GFA, et rincés avec du milieu à 0°C. La radioactivité retenue dans les levures est quantifiée par scintillation liquide. La perméabilité au glycérol est exprimée en nmoles de glycérol captées par les levures en fonction du temps, en considérant que l'effet lié au métabolisme du glycérol (pouvant former des molécules sortant rapidement) est négligeable pendant la durée de l'expérience.

V.B.1.d Préparation des membranes de levure

Pour les expériences de mesures des coefficients de sédimentation, nous avons choisi de préparer les membranes à partir des levures W303 transformées avec le vecteur pYX222 portant l'ORF de l'AQP3 de rat. L'isolation des membranes de levures a été effectuée suivant le protocole de Huang *et al.* (Huang *et al.*, 1996). 500 ml de culture de levures ayant atteint une DO₆₀₀ = 1 sont centrifugés à 4500g pendant 5 minutes et lavés une fois à l'eau. Le culot de levures est resuspendu dans un tampon d'homogénéisation [28 mM Tris pH 8,5, 0,2 M saccharose, 5,4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml leupeptine, 5 μ g/ml pepstatine]. Les levures sont cassées à 4°C en vortexant et en secouant vigoureusement à avec des billes de verre pendant 15 minutes. Le culot récupéré grâce à une première centrifugation à 1600g pendant 10 minutes est resuspendu dans le même tampon puis les levures restantes sont cassées. Les débris cellulaires sont retirés par une deuxième centrifugation. Les deux surnageants contenant les membranes sont réunis et le culot de membranes est collecté après une centrifugation de 100000g pendant 1 heure à 4°C et resuspendu dans 500 μ l de tampon d'homogénéisation, pH 7,4, dépourvu de saccharose. La fraction membranaire est conservée à -20°C. Le dosage au Micro BCA indique une concentration de protéines membranaires d'environ 14 mg/ml. Pour la détection de la présence d'AQP3 dans les levures, 10 μ g de protéines membranaires sont

séparées sur gel SDS-PAGE puis révélées par immunotransfert grâce à l'anticorps anti AQP3 purifié, dilué 500 fois.

V.B.2. Mesure des coefficients de sédimentation

V.B.2.a Préparations membranaires

Préparation des membranes d'érythrocytes.

Les globules rouges sont lavés trois fois dans un tampon Carlsen [154 mM NaCl, 5 mM D-glucose, 0,25 mM KH₂PO₄, 0,25 mM Na₂HPO₄, pH 7,4] (Carlsen et Wieth, 1976) puis centrifugés à 2000g pendant 10 minutes à 8°C. Les fantômes d'hématies sont obtenus suivant le procédé de Ojcius *et al.* (Ojcius *et al.*, 1988). Les érythrocytes lavés sont lysés dans un milieu hypotonique [5 mM Na₂HPO₄, pH 8,0] contenant 20 µg/ml de PMSF et 2 µg/ml de pepstatine. Ils sont centrifugés pendant 25 minutes à 25000g à 4°C puis le culot membranaire est repris dans le même tampon à environ 10 mg/ml.

Préparation des membranes de médullaire externe de rein de rat (en collaboration avec Christine Leroy).

Le cortex et la médulla interne sont disséqués à l'aide d'un scalpel. La médullaire externe est coupée en petits morceaux puis homogénéisée à l'homogénéiseur de Dounce (20 coups) à 4°C dans un milieu contenant 0,1 mg/ml de PMSF et un mélange d'inhibiteurs de protéases. Une première centrifugation est effectuée pour enlever les débris et noyaux (5000g, 20 minutes). La fraction membranaire est obtenue dans le culot après une centrifugation de 30 minutes à 48000g. Les échantillons sont repris et aliquotés à une concentration de 30 mg/ml, puis congelés à -80°C.

V.B.2.b Solubilisation des protéines par divers détergents

Les protéines membranaires de globules rouges (800µg), d'ovocytes (250 µg) et de levures (700 µg) exprimant AQP3, sont solubilisées dans 100 µl d'un tampon [20 mM Tris (pH 7.4), 1 mM DTT] contenant 1% SDS, 1% Triton X-100, 2% N-Octyl β-D glucopyranoside (OG) ou 2% N-lauroyl-sarcosine (NLS) pendant 16 heures à 4°C (Lagree *et al.*, 1998a). Une centrifugation à 100000g pendant 30 minutes à 4°C permet de séparer le matériel non solubilisé des protéines solubilisées.

V.B.2.c Séparation des protéines solubilisées sur gradient de saccharose

Les gradients continus de saccharose (2% à 20%) sont réalisés avec les tampons (20 mM Tris pH 7,4, 1 mM DTT) contenant le détergent (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2% OG ou 2% NLS) et le saccharose (2% ou 20%) à l'aide d'une pompe péristaltique (Lagree *et al.*, 1998a). 100 µl de protéines membranaires solubilisées sont déposés sur le haut du gradient et le tout est mis à centrifuger pendant 16 heures à 5°C à 100000g. Un mélange de 20 µg de β-amylase (8,9 S), 20 µg de sérum albumine bovine (4,3 S) et 20 µg de cytochrome c (1,8 S) est utilisé comme marqueur de coefficients de sédimentation. 20 fractions de 250 µl sont collectées à partir du fond du tube.

V.B.2.d Analyse des fractions par immunoblot

10 µl de chaque fraction sont analysés par immunoblot. La révélation est réalisée soit avec le sérum total dilué 1000 fois dirigé contre l'AQP1 humaine complète, soit le sérum total dilué 500 fois dirigé contre le peptide C-terminal de l'AQP3 de rat. 10 µl des fractions obtenues avec le mélange de marqueurs de sédimentation sont déposés sur gel SDS-PAGE

en vue de déterminer leur position dans le gradient pour tracer la courbe d'étalonnage (réalisée pour chaque détergent).

V.B.3. Déglycosylation des protéines

10 µg de protéines membranaires sont traités avec une solution composée de 0,5% SDS, 1,3% NP40, 100 mM β-mercaptoethanol, 10 mM phénantroline et 1 U de N-glycosidase F (Boehringer) durant 16 heures à 37°C. Dans les expériences témoins, l'enzyme est remplacée par l'eau. Un immunoblot est ensuite réalisé sur ces protéines avec le sérum total anti AQP3 dilué 500 fois.

V.B.4. Microscopie électronique sur cryofractures de membranes d'ovocytes

V.B.4.a Préparation des répliques

Les ovocytes injectés avec 50 nl d'eau, ou 50 nl d'ARNc d'AQP1 ou d'AQP3 (200 ng/µl) sont fixés à la glutaraldéhyde 2% contenue dans du Barth pendant 30 minutes à 18°C. Ils sont ensuite lavés dans le Barth. Les ovocytes sont coupés en deux et la substance vitelline est éliminée à l'aide d'une aiguille. Les membranes sont imprégnées avec une solution de Barth contenant 30% de glycérol pendant une heure à température ambiante puis congelées dans l'azote liquide. Les échantillons congelés sont fracturés dans un appareil Balzers 300 sous un vide de 10^{-6} Torr à -150°C. Les surfaces fracturées sont recouvertes d'une couche de platine à 45° puis ombragées de carbone à 90°. Les répliques sont nettoyées à l'eau de javel puis rincées à l'eau distillée. Elles sont observées sous un microscope électronique Philips EM 400 à 80 kV.

V.B.4.b Calcul de la densité de particules

Des séries d'images de fractures ont été agrandies d'un facteur 46000 dans le but de visualiser le nombre de particules intramembranaires sur la face P comme décrit par Zampighi *et al.* (Zampighi *et al.*, 1995). Une moyenne de la densité de particules a été calculée sur trois ovocytes à partir desquels plusieurs photos ont été réalisées dans différentes régions de la membrane.

V.B.4.c Calcul du diamètre des particules

Quelques photos ont été amplifiées d'un facteur plus important, 800000 environ, pour estimer la taille des particules. Les résultats seront présentés sous forme d'un graphe montrant la taille des particules observées en fonction de leur fréquence. Les ovocytes injectés à l'eau contiennent les particules endogènes, alors que les ovocytes exprimant AQP1 et AQP3 contiennent des particules endogènes mais aussi les particules exogènes qui sont attribuées à AQP1 et AQP3.

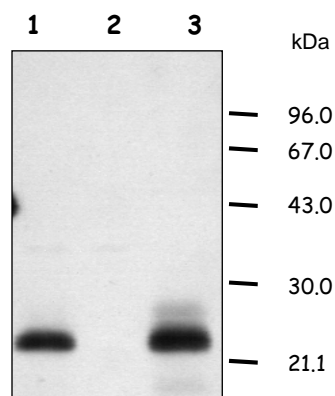
V.C. RESULTATS

V.C.1. Expression d'AQP3 dans la levure

V.C.1.a Détection de l'expression d'AQP3 dans la levure

La figure ci-dessous montre le résultat de l'immunoblot effectué avec l'anticorps anti-AQP3 sur les protéines membranaires totales de levure. L'anticorps anti-AQP3 reconnaît bien une bande à environ 24 kDa dans les levures ayant poussé dans un milieu qui permet l'expression d'AQP3 (milieu avec glucose pour les levures transformées avec le vecteur constitutif pYX222/AQP3 et milieu avec galactose pour les levures transformées avec le vecteur inducible par le galactose pYX223/AQP3. Par contre, aucun signal n'est observé dans les levures transformées avec le vecteur inducible par le galactose qui ont poussé sur glucose, confirmant la spécificité de l'anticorps pour AQP3. On note une absence de glycosylation d'AQP3 dans ces membranes de levure.

Figure V.2: Détection d'AQP3 dans les levures

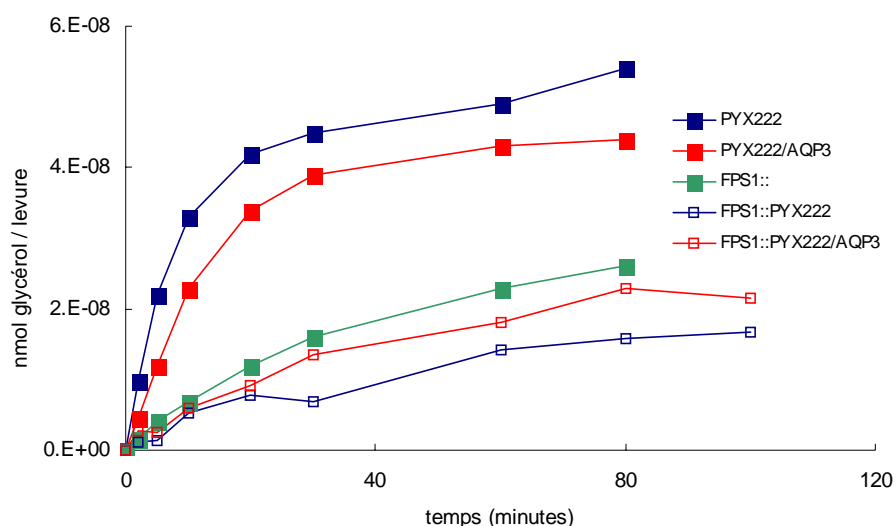


Les levures transformées avec le vecteur pYX222-AQP3 (promoteur constitutif) cultivées en milieu contenant du glucose (1) ou les levures transformées avec le vecteur pYX223-AQP3 (promoteur inducible par le galactose) cultivées en milieu glucose (2) ou galactose (3) sont révélées avec l'anticorps anti-AQP3 purifié.

V.C.1.b Cinétique de transport de glycérol

Afin de vérifier si l'AQP3 exprimée dans les levures est bien fonctionnelle, nous avons mesuré l'entrée de ^{14}C -glycérol 1 mM en fonction du temps des levures transformées ou non avec les différentes constructions.

Figure V.3: Entrée de ^{14}C -glycérol 1mM dans les levures en fonction du temps

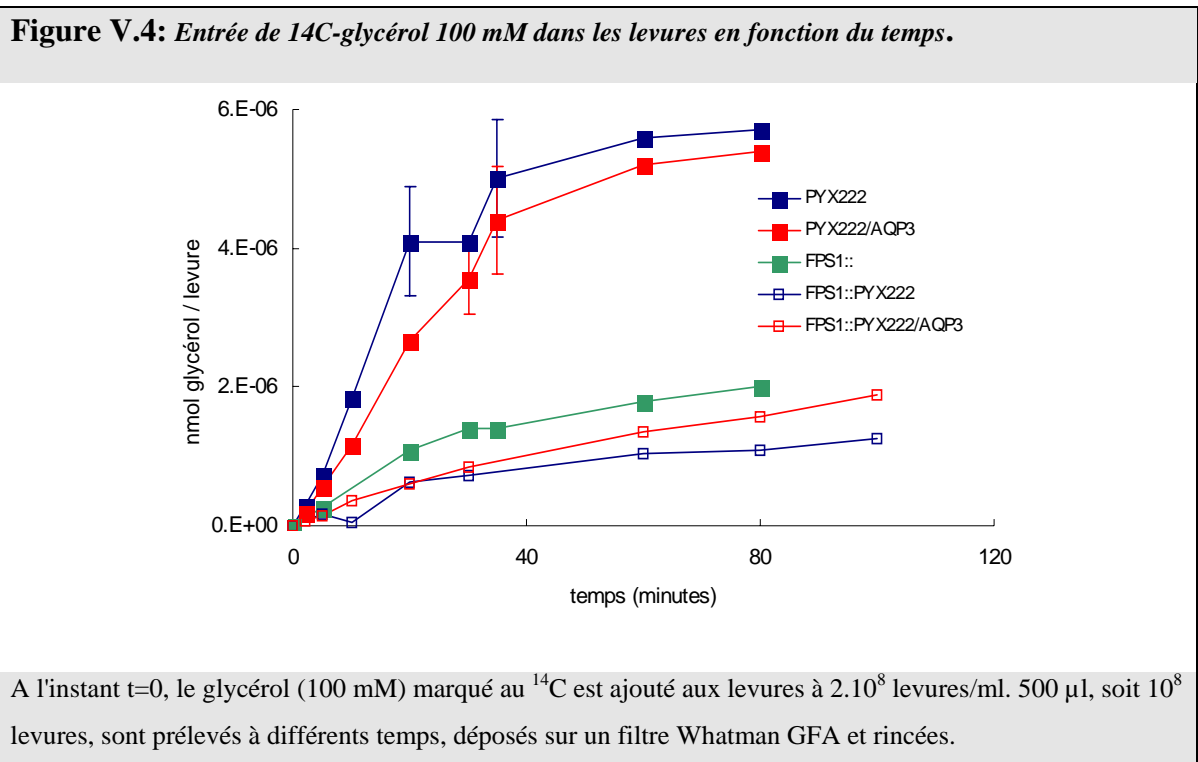


A l'instant $t=0$, le ^{14}C -glycérol (1 mM) est ajouté aux levures à 2.10^8 levures/ml. 500 μl (10^8 levures) sont prélevés à différents temps, déposés sur un filtre et rincés.

Pour cette concentration de glycérol choisie (1 mM), aucune différence significative de la vitesse d'entrée de glycérol n'est observée entre les levures exprimant AQP3 (pYX222/AQP3) et les levures témoins (pYX222). Afin de savoir si la méthode utilisée pour mesurer le transport de glycérol est efficace et si la transport de glycérol à travers AQP3 n'est pas masqué par le facilitateur endogène de glycérol de la levure, Fps1, l'expérience a été effectuée sur des levures dont le gène Fps1 a été disrupté (*fps1::*).

Les résultats montrent d'une part que l'absence de Fps1 dans les levures ralentit le transport de glycérol montrant la validité de l'expérience, et d'autre part, que la présence d'AQP3 dans ces mêmes levures n'augmente pas la perméabilité au glycérol.

Le canal AQP3 possède peut-être une faible affinité pour le glycérol, nous avons donc réalisé la même expérience avec 100 mM de ^{14}C -glycérol (figure ci-dessous).



Les résultats montrés dans la figure V.4 indiquent que même en augmentant la concentration de glycérol, on ne peut visualiser la fonction de facilitateur de glycérol à travers AQP3, que ce soit dans la levure sauvage, ou dans la levure dont le gène Fps1 a été disrupté.

Ces résultats pourraient s'expliquer de plusieurs manières:

1) la protéine n'est tout simplement pas présente à la membrane plasmique de la levure, ce qui pourrait expliquer qu'elle ne soit pas glycosylée si elle est sous une forme non mature,

2) elle est bien adressée à la membrane plasmique mais elle n'est pas fonctionnelle:

a) parce qu'elle n'est pas exprimée en suffisamment grande quantité mais l'immunotransfert montre que sa quantité n'est pas négligeable,

b) parce qu'elle n'est pas glycosylée, mais la glycosylation n'est pas nécessaire à la fonction d'AQP1 et d'AQP2,

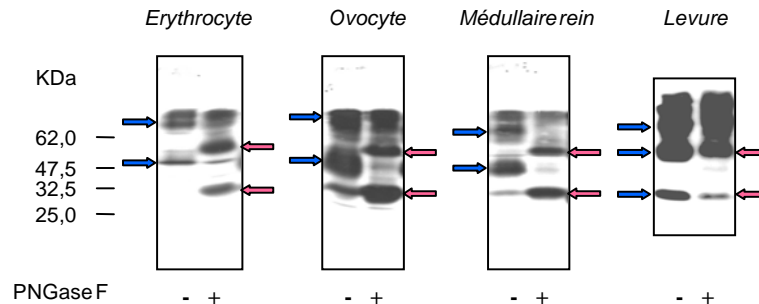
c) parce qu'elle a une structure modifiée.

Pour ma part, je pencherai plutôt pour la première hypothèse, AQP3 est présente dans les membranes des compartiments internes. Le moyen d'y répondre serait d'effectuer des marquages en immunocytochimie ou bien de séparer les membranes des différents compartiments intracellulaires par gradients de saccharose et d'analyser la présence d'AQP3 dans les différentes fractions par immunotransfert.

V.C.2. Déglycosylation d'AQP3 exprimée dans les différentes membranes

Le profil d'AQP3 observé après immunotransfert est différent de celui observé pour AQP1 dans le globule rouge. Alors qu'AQP1 est sous une forme monomérique non glycosylée et une forme monomérique glycosylée, AQP3 est présente sous forme de trois bandes, dont la plus basse n'est pas toujours visible, surtout dans le globule rouge. Afin de savoir si les bandes de hauts poids moléculaires pouvaient être des formes glycosylées, une expérience de déglycosylation à la PGNase F a été réalisée.

Figure V.5: Déglycosylation d'AQP3 exprimée dans différentes membranes



Les protéines des différentes membranes ont été déglycosylées avec la PNGase F. Dans les contrôles négatifs, l'enzyme a été remplacée par de l'eau. 10 µg de protéines membranaires sont traités avec 0,5% SDS, 1,3% NP40, 100 mM β-ME, 10 mM phénantroline et 1 unité PNGase-F (remplacée par de l'eau dans les témoins).

Le profil d'AQP3 dans les membranes témoins présente un profil identique à celui déjà connu pour ces membranes, c'est à dire trois bandes (deux dans les érythrocytes) dont deux majoritaires de haut poids moléculaire (flèches bleues). Par contre, les membranes de levure exprimant AQP3 ont un profil différent de celui observé plus haut. Ici, des bandes supplémentaires plus hautes sont visibles et pourraient plutôt correspondre à des formations d'oligomères plutôt qu'à une forme glycosylée puisqu'aucune forme glycosylée n'était observable sur l'immunotransfert précédent et que les membranes utilisées proviennent de la même préparation membranaire de levure.

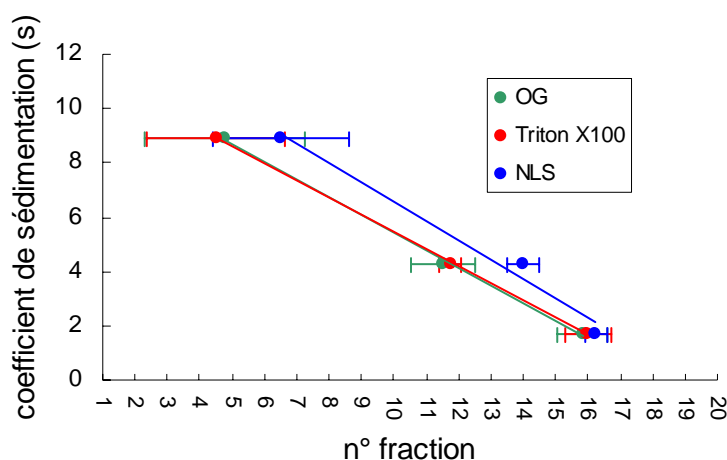
L'action de la PNGase F modifie le profil d'AQP3 provenant de membranes d'érythrocytes, d'ovocytes ou de médullaire externe de rein de rat mais ne modifie pas celui d'AQP3 exprimé dans la levure. Ceci démontre l'absence de glycosylation d'AQP3 dans la levure et indique que les formes hautes sont bien dues à la présence d'oligomères qui ce sont sans doute formés par des phénomènes d'agrégation. Dans les autres membranes, on voit très nettement l'apparition d'une bande intense correspondant à un monomère et d'une bande qui correspondrait à un dimère (flèches rouges). Nous noterons que ce dimère est résistant au SDS (1,3% pendant la déglycosylation et environ 2,5% final avant dépôt) mais aussi au β-ME à 100 mM.

V.C.3. Détermination des coefficients de sédimentation

V.C.3.a Courbe d'étalonnage

Les courbes ci-dessous ont été obtenues avec le mélange de protéines de coefficients de sédimentation connus qui a été soumis à une centrifugation sur gradient de saccharose dans les mêmes conditions que les protéines membranaires de différentes membranes. Elles ont été réalisées deux ou trois fois pour un même détergent.

Figure V.6: Courbe d'étalonnage des coefficients de sédimentation



La courbe d'étalonnage a été obtenue par sédimentation sur gradient de saccharose d'un mélange de protéines (20 µg de chaque) dont les coefficients de sédimentation sont connus: β -amylase (8,9 S), BSA (4,3 S) et cytochrome c (1,8 S). Le mélange a subi l'étape de solubilisation avec les détergents, avant le dépôt sur gradient.

Les résultats montrent que les protéines solubilisées dans l'OG et le Triton X-100 sédimentent approximativement dans les mêmes fractions. En revanche, les protéines solubilisées en NLS montrent un déplacement vers les fractions légères par rapport aux positions obtenues avec les deux autres détergents.

On observe également une plus grande variation de position pour les protéines à haut coefficient de sédimentation solubilisées par le même détergent d'une expérience à l'autre.

Les équations moyennes des droites représentées ont été calculées:

$$S_{OG} = -0,6524 \times (\text{n}^\circ \text{ fraction}) + 11,944$$

$$S_{Triton} = -0,627 \times (\text{n}^\circ \text{ fraction}) + 11,707$$

$$S_{NLS} = -0,707 \times (\text{n}^\circ \text{ fraction}) + 13,627$$

Ces équations permettront un calcul approximatif du coefficient de sédimentation basé sur la position de la protéine dans le gradient de saccharose (n° de fraction).

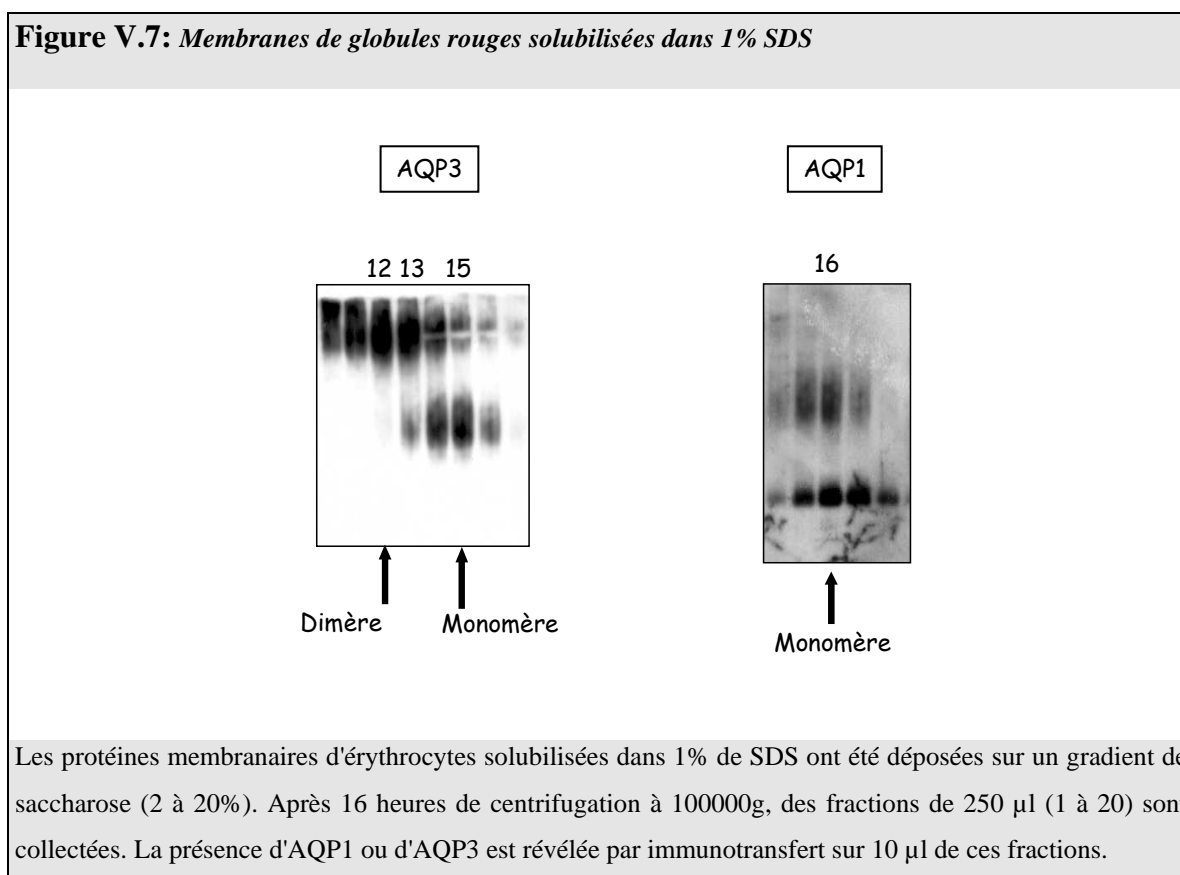
V.C.3.b Solubilisation des membranes en SDS

Le SDS est un détergent dénaturant connu pour séparer les sous-unités entre elles. AQP1 est tétramérique dans les membranes, et la valeur de son coefficient de sédimentation est d'environ 5,7 S après solubilisation des membranes d'érythrocytes dans le Triton X-100, et de 2 S après solubilisation dans le SDS (Smith et Agre, 1991). Nous avons tout d'abord solubilisé les membranes de tissus exprimant AQP1 et/ou AQP3 dans le SDS afin de connaître les positions de ces protéines dans le gradient à l'état monomérique. Les membranes de globules rouges ont l'avantage de posséder AQP1, dont le coefficient de sédimentation est connu (2 S), et AQP3. Ces deux protéines extraites des mêmes globules rouges seront donc déposées sur un même gradient de saccharose et seront soumises à la même centrifugation, limitant ainsi les variations qui seraient dues à un dépôt des membranes solubilisées sur un gradient différent. La glycosylation importante d'AQP3 dans les membranes natives et dans les ovocytes exprimant AQP3 peut modifier la valeur du coefficient de sédimentation. L'AQP3 exprimée dans les levures n'est pas glycosylée et

la comparaison des valeurs de coefficients de sédimentation obtenus avec ces membranes de levure et les autres membranes nous indiquera si cette glycosylation peut faire varier la valeur de ce coefficient.

Membranes de globules rouges humains

La figure suivante montre le résultat des immunoblots obtenu sur les fractions de membranes de globules rouges solubilisées en SDS. Les mêmes fractions ont été révélées avec l'anticorps anti-AQP1 ou avec l'anticorps anti-AQP3.



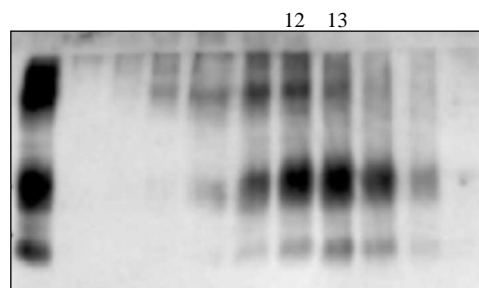
AQP1 solubilisée dans le SDS est effectivement retrouvée dans une fraction légère (16) qui correspond à la position d'un monomère. AQP3 est retrouvée dans deux fractions distinctes: dans la fraction 15 et dans des fractions plus lourdes (12-13). Dans la fraction 15, après migration sur le gel, on visualise un monomère glycosylé et dans les fractions 12-

13, on observe une bande de la taille d'un dimère. Ce dimère semble toujours résistant à la solubilisation en SDS. Ce dimère ne peut correspondre à une agrégation à une étape ultérieure au gradient de sédimentation puisque la fraction est différente de celle où le monomère est observé. On peut vraisemblablement imaginer que les formes observées sur le gel sont bien celles qui ont été séparées pendant la centrifugation, et que la solubilisation avec 1% de SDS a donc donné une forme monomérique pour AQP1 (déjà décrite dans la littérature), avec la forme glycosylée un peu plus lourde, et deux formes pour AQP3, une forme monomérique et une forme dimérique, glycosylées.

Membranes d'ovocytes exprimant AQP3

Les formes obtenues après solubilisation en SDS des membranes d'ovocytes de xénope exprimant AQP3 sédimentent dans des fractions légèrement décalées par rapport à celles obtenues avec les membranes de globules rouges. L'immunoblot ci-dessous montre une forme monomérique dont le pic est situé dans la fraction 13 et une forme dimérique dont le pic est présent dans la fraction 12.

Figure V.8: Membranes d'ovocytes AQP3 solubilisées dans 1% SDS

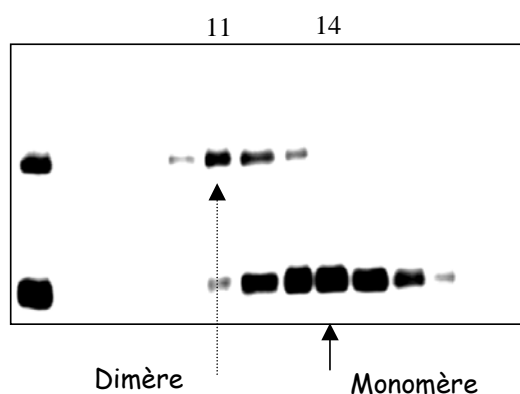


Le puits de gauche représente une fraction des membranes totales d'ovocytes exprimant AQP3 avant dépôt sur gradient de saccharose.

Membrane de levure exprimant AQP3

On observe sur l'immunoblot ci-dessous une forme monomérique d'AQP3 migrant dans les fractions 13-14-15 (pic très large) et une forme dimérique, non dénaturée par le SDS, qui sédimente dans les fractions 11-12.

Figure V.9: *Membranes de levures solubilisées dans 1% SDS*



Le premier puits à gauche correspond à une fraction des membranes totales solubilisées dans le SDS avant dépôt sur gradient.

Conclusion:

Après solubilisation des membranes de globules rouges par le SDS, nous avons observé qu'AQP1 sédimentait dans une fraction légère (16) dans le gradient de saccharose, cette fraction contient les protéines ayant une valeur de coefficient de sédimentation d'environ 2 S qui correspond à un monomère. AQP3 solubilisée à partir de ces mêmes membranes est retrouvée dans une fraction équivalente (15) sous forme de monomère. Ces résultats montrent que ces deux canaux hydriques dans les membranes de globules rouges, une fois solubilisés par le SDS, apparaissent sous une forme monomérique. Cependant, on trouve également une forme dimérique d'AQP3 sur ce même immunoblot qui sédimente dans une fraction plus lourde (12-13), cette forme dimérique était déjà présente avant la séparation des protéines sur gradient de saccharose. Cette forme dimérique est résistante à la solubilisation par le SDS (1% avant dépôt sur gradient de saccharose et 2,5% avant

dépôt sur gel SDS), mais aussi à la dénaturation par l'agent réducteur DTT (agissant au niveau des cystéines), 8,5 mM, utilisé pour dénaturer la protéine avant dépôt sur gel SDS-PAGE.

Nous avons ensuite utilisé des détergents considérés comme étant non dénaturants afin de visualiser la position d'AQP1 et d'AQP3 dans le gradient de saccharose après séparation par centrifugation et d'en déduire l'organisation membranaire de ces canaux hydriques puisque cette méthode a permis de confirmer la structure tétramérique de certaines aquaporines. Elle a aussi été utilisée pour montrer que GlpF se trouvait dans des fractions légères qui correspondent au coefficient de sédimentation d'un monomère. Cependant, elle n'a pour l'instant jamais été effectuée sur les aquaglycéroporines et nous l'avons donc testée sur AQP3.

V.C.3.c Solubilisation des membranes en Triton X-100

Nous avons commencé par les détergents non dénaturants les plus utilisés dans ce genre d'expériences, c'est à dire l'OG et le Triton X-100 à des concentrations décrites dans la littérature, 1% pour le Triton X-100 et 2% pour l'OG.

Membranes de globules rouges humains

Seul l'immunoblot révélé avec l'anticorps anti-AQP1 est montré car l'immunoblot révélé avec l'anticorps anti-AQP3 montre que des agrégats ont été formés lors de la solubilisation avec le Triton X-100.

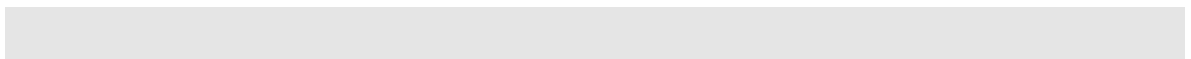
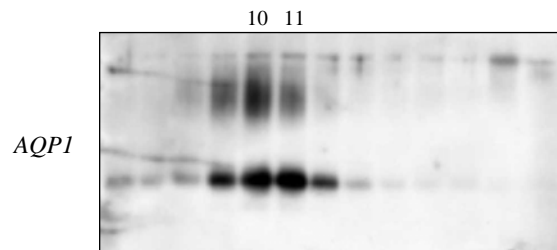


Figure V.10: Membranes de globules rouges solubilisées dans 1% Triton X-100



Les membranes de globules rouges ont été solubilisées dans 1% de Triton X-100 avant dépôt sur gradient de saccharose et centrifugation à 100000g toute une nuit à 5°C. Seules les fractions 6 à 18 ont été déposées sur gel et révélées par immunoblot à l'aide de l'anticorps anti-AQP1.

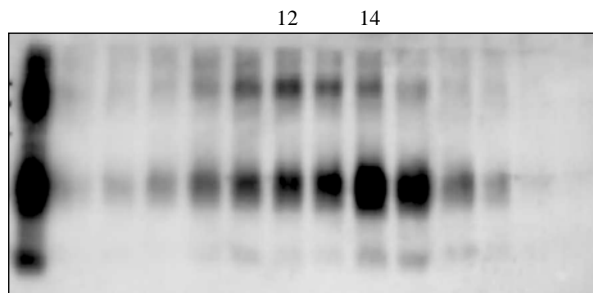
Le résultat ci-dessus montre une sédimentation de l'AQP1 dans la fraction 10. D'après l'équation de la droite d'étalonnage obtenue avec les marqueurs de coefficient de sédimentation connus (voir matériel et méthodes), on obtient un coefficient de sédimentation d'environ 5,4 S. Sachant que le numéro de la fraction n'est qu'estimée et que la droite d'étalonnage possède des barres d'erreur, cette valeur n'est qu'approximative. Elle est cependant en accord avec la valeur de 5,7 S obtenue par d'autres auteurs dans le même détergent non dénaturant (Smith et Agre, 1991) qui correspondrait à une forme tétramérique.

La solubilisation des membranes de globules rouges n'ayant pas donné de résultats satisfaisant pour AQP3, les expériences ont été réalisées sur les membranes de systèmes hétérologues exprimant AQP3: l'ovocyte de xénope et la levure.

Membranes d'ovocytes exprimant AQP3

Les résultats représentés sur la figure V.11 montrent un pic dans la fraction 14 dans lequel est observé une forme monomérique majoritairement glycosylée et un autre pic dans la fraction 12 qui correspond à la forme dimérique d'AQP3. La fraction 14 correspond à un coefficient de sédimentation calculé de 2,9 S et la fraction 12 correspond à un coefficient de sédimentation de 4,2 S environ.

Figure V.11: Membranes d'ovocytes exprimant AQP3 solubilisées dans 1% Triton X-100



Les fractions 7 à 19 ont été déposées. Le premier puits à gauche contient un échantillon des membranes totales d'ovocytes totales n'ayant pas subi de centrifugation sur gradient de saccharose.

Membranes de levures exprimant AQP3

Nous n'avons pas obtenu de résultats avec les membranes de levures exprimant AQP3 solubilisées avec le Triton X-100. En effet, il s'est formé des agrégats protéiques, qui pourraient provenir du rapport protéine/détergent trop élevé.

V.C.3.d Solubilisation des membranes en OG

Membranes de globules rouges humains

Les immunoblots ci-dessous montrent les positions d'AQP1 et d'AQP3 après solubilisation dans 2% d'OG et centrifugation sur gradient de saccharose.

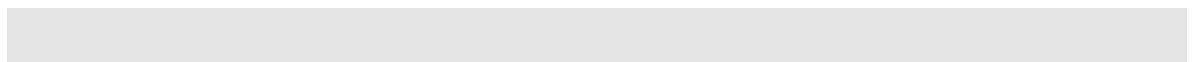
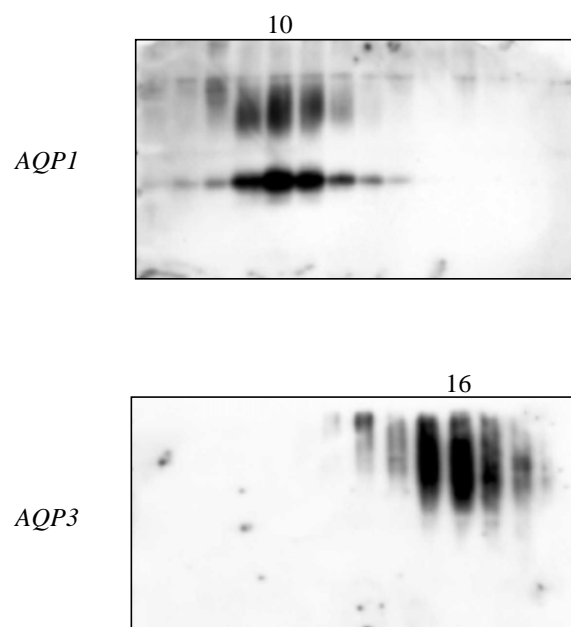


Figure V.12: Membranes de globules rouges solubilisées dans 2% d'OG



Les fractions provenant du même gradient (fractions 6 à 19) ont été déposées sur les deux gels dont les immunoblots sont représentés ci-dessus. L'immunoblot du haut a été révélé avec l'anticorps anti-AQP1 et celui du bas avec l'anticorps anti-AQP3.

Ce sont les mêmes fractions qui proviennent du même gradient qui ont été déposées sur les gels (6 à 19). On observe clairement une différence dans la sédimentation de ces deux protéines. AQP1 n'a pas été dénaturée par l'OG et sédimente dans la fraction 10. On obtient un coefficient de sédimentation pour AQP1 provenant de membranes de globules rouges solubilisées dans l'OG équivalent à 5,4 S. En ce qui concerne AQP3, sur plusieurs immunoblots effectués à partir d'au moins deux gradients, il nous a été difficile d'obtenir des résultats comme celui présenté ci-dessus car la plupart du temps, AQP3 s'agréait, comme avec le triton, sur les membranes de globules rouges ou de levures. L'immunoblot montre effectivement que le profil obtenu n'est pas habituel et la forme monomérique glycosylée est confondue avec la bande dimérique. On peut cependant noter la position de

cette bande étalée dans la fraction 16, qui donne un coefficient de sédimentation d'environ 1,5 S.

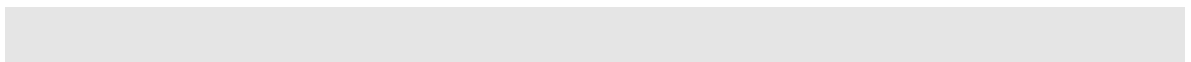
Concernant les solubilisations des membranes de levure solubilisées en OG, on note toujours la formation d'aggrégats et la solubilisation des membranes d'ovocytes par l'OG n'a été effectuée qu'une seule fois et aucune indication concluante n'a pu être tirée de l'observation de cet immunoblot.

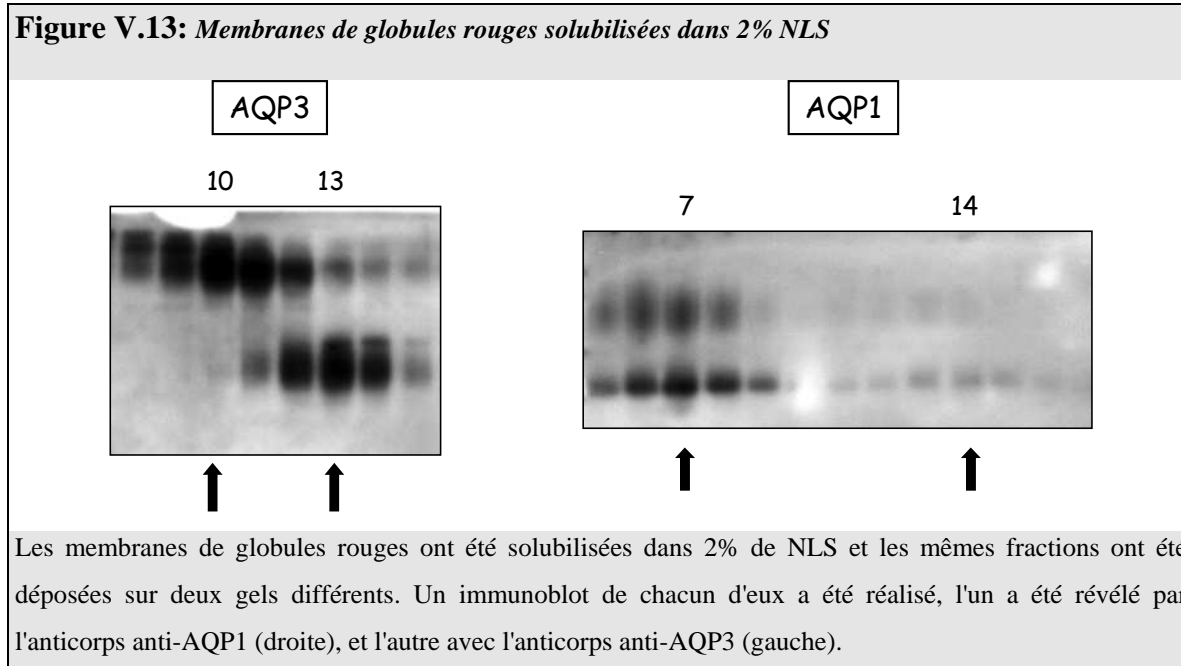
V.C.3.e Solubilisation des membranes en NLS

Les détergents non-dénaturants précédemment utilisés ne nous ayant pas donné de résultats concluants avec AQP3, nous avons solubilisé les membranes avec le NLS à 2%, qui est un détergent anionique. Nous savons que ce détergent solubilise difficilement AQP1 dans les membranes de globules rouges puisqu'il est utilisé pour séparer AQP1 par traitement différentiel avec des détergents. Nous avons pensé qu'AQP3 pouvait être également difficilement solubilisable par ce détergent et pourrait empêcher la formation d'aggrégats.

Membranes de globules rouges

Les membranes de globules rouges ont été solubilisées dans le détergent NLS qui est considéré comme un détergent non dénaturant.



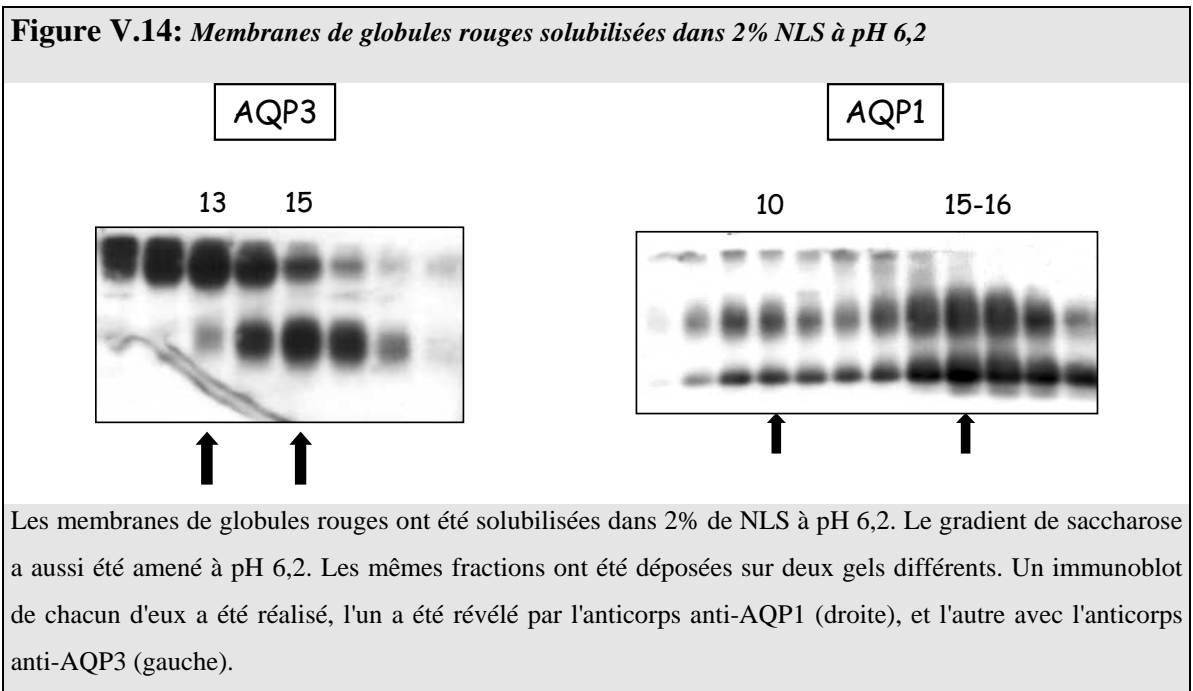


AQP1 est observé majoritairement dans une fraction lourde dont le coefficient de sédimentation correspond à 8,7 S. On devine également la présence d'AQP1 dans la fraction n°14 dont le coefficient de sédimentation est de 3,7 S. Quant à AQP3, un monomère est visible dans les fractions 12 à 14 (pic à 13 de coefficient 4,4 S) et un dimère est visible dans les fractions 8 à 12 (pic 10 de coefficient de sédimentation 6,5 S).

Ces résultats montrent des valeurs de coefficient de sédimentation très hétérogènes qui sont différents de ceux obtenus avec l'OG et le Triton. On observe aussi un déplacement des coefficients de sédimentation vers les fractions lourdes alors que les marqueurs de coefficient de sédimentation sont déplacés vers les fractions légères.

Les travaux de Zeuthen *et al.* ont montré un effet du pH sur les perméabilités à l'eau et au glycérol d'AQP3 exprimée dans les ovocytes de xénope, mais aucun effet n'a été observé sur la perméabilité hydrique d'AQP1. En particulier, à pH 6,2, le transport de glycérol est à son maximum, alors que le transport d'eau est quasiment inexistant (Zeuthen et Klaerke, 1999).

La solubilisation a donc été effectuée à pH 6,2 afin d'observer un éventuel effet du pH sur les interactions entre sous-unités. Les résultats sont représentés sur l'immunoblot ci-dessous.



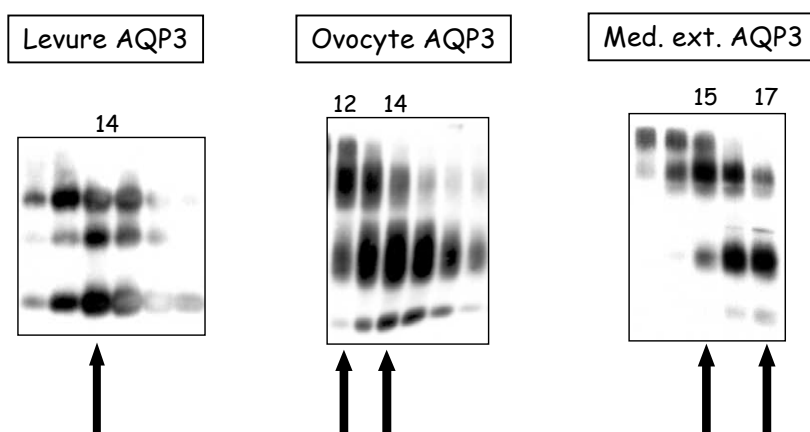
Le monomère d'AQP3 est observé dans la fraction 15 à pH 6,2 alors qu'il était présent dans la fraction 13 à pH 7,4. Le dimère est observé dans la fraction 13 à pH 6,2 au lieu de 10 à pH 7,4. Nous n'avons pas déposé les marqueurs de coefficient de sédimentation pour le NLS à pH 6,2, mais nous ne pouvons imaginer qu'un tel déplacement dans les fractions soit dû à un changement du nombre de sous-unités, il peut par contre être dû à une fixation moins importante de détergents à cause d'un changement de conformation de la protéine comportant des résidus protonés. En revanche, un déplacement très net d'AQP1 est observé. En effet, AQP1 est présent majoritairement dans des fractions légères (15-16), indiquant une dissociation des sous-unités par la solubilisation à pH 6,2 dans 2% de NLS. On note une proportion minimale d'AQP1 dans les fractions 9 à 10. A pH 7,4, la fraction

majoritaire était la fraction 7 et la fraction minoritaire était la fraction 14, indiquant le même décalage observé sur AQP3 entre pH 7,4 et pH 6,2.

Membranes de levure et d'ovocytes exprimant AQP3 et membranes de médullaire externe de rein de rat.

Contrairement aux autres détergents, le NLS solubilise correctement AQP3 sans induire la formation d'aggrégats (figure V.15).

Figure V.15: Autres membranes solubilisées dans 2% NLS



Les protéines membranaires de levures ou d'ovocytes exprimant AQP3, ou de médullaire externe de rein de rats solubilisées dans 2% de NLS ont été déposées sur un gradient de saccharose (2 à 20%). Après 16 heures de centrifugation à 100000g, des fractions de 250 µl (1 à 20) sont collectées. La présence d'AQP3 est révélée par immunotransfert sur 10 µl de ces fractions.

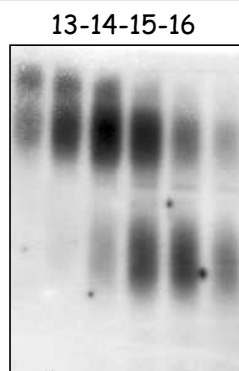
Nous observons une sédimentation d'AQP3 dans des fractions différentes suivant les membranes à partir desquelles elle a été solubilisée. Les monomères sont visualisés dans les fractions 17 (membranes de médullaire externe) et 14 (membranes d'ovocytes ou de levures) et les dimères sont dans les fractions 15 (médullaire externe), 12 (ovocytes) et 14 (levures). Le dimère observé dans la fraction 14 d'AQP3 solubilisée à partir des

membranes de levure résulte sans doute d'une agrégation formée après la centrifugation sur gradient de saccharose puisqu'il n'est pas toujours visible sur les immunoblots effectués à partir de la même préparation membranaire.

Membranes d'ovocytes exprimant la chimère AQP3-AQP2 Cter

Nous avons vu que la chimère AQP3-AQP2 Cter rendait les membranes des ovocytes dans lesquelles elle était exprimée perméables au glycérol mais non perméables à l'eau, tel un facilitateur de glycérol. Nous voulions savoir si son état d'oligomérisation était modifié. La figure ci-dessous montre le résultat obtenu après solubilisation dans 2% de NLS et centrifugation sur gradient de saccharose.

Figure V.16: *Membranes d'ovocytes exprimant AQP3-AQP2 Cter solubilisées dans 2% NLS*



Les protéines membranaires d'ovocytes exprimant la chimère AQP3-AQP2 Cter solubilisées dans 2% de NLS ont été déposées sur un gradient de saccharose (2 à 20%). Après 16 heures de centrifugation à 100000g, des fractions de 250 µl (1 à 20) sont collectées. La présence de la chimère dans les différentes fractions est révélée avec un anticorps anti-AQP2 dirigé contre l'extrémité C-terminale d'AQP2.

Cette chimère se comporte de la même façon que l'AQP3 sauvage exprimée dans l'ovocyte de xénope, avec la présence de monomères dans les fractions 15-16 et de dimères dans les fractions 13 à 15. La séquence C-terminale d'AQP2 insérée à la place de celle d'AQP3 ne modifie pas considérablement le coefficient de sédimentation d'AQP3.

RECAPITULATIF DU CALCUL DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION:

	Triton X-100 1%	OG 2%	NLS 2%
GR AQP1	F 10-11= 4,8-5,4 S	F10= 5,4 S	F7= 8,7 S
GR AQP3	Agrégats	(F16= 1,5 S)	Mono F13-14= 3,7-4,4 S Di F10=6,5 S
Ovocyte AQP3	Mono F14= 2,9 S Di F 12= 4,2 S	Agrégats	Mono F14-15= 4,4-3,0 S Di F12= 5,1 S
Levure AQP3	Agrégats	Agrégats	Mono F14= 4,4 S
Méd. Ext. AQP3	ND	ND	Mono F17= 1,6 S Di F15= 3,0 S

GR: globules rouges, F: numéros des fractions, Mono: position des monomères dans les fractions, Di: position des dimères dans les fractions.

Les valeurs trouvées sont très hétérogènes et montrent que l'on ne peut en aucun cas relier la valeur des coefficients de sédimentation trouvées avec l'état d'oligomérisation de la protéine. On s'aperçoit que ce coefficient varie en fonction de divers paramètres qui sont souvent trop nombreux dans nos expériences, ce sont le détergent (qui peut faire varier la quantité de détergent liée), les membranes utilisées, le rapport protéines/lipides, la glycosylation (qui n'est pas forcément la même dans les membranes des systèmes utilisés et qui est absente dans la levure), et l'éventuelle variation de composition d'un gradient à l'autre. De plus, la procédure de calibration de tailles a été faite avec des protéines solubles, et les protéines membranaires solubilisées se comportent différemment, leur rayon de Stokes est souvent surestimé lorsque la calibration a lieu avec des protéines globulaires solubles (Le Maire *et al.*, 1986).

Rappel:
$$S = \frac{M \times (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{6 \cdot \pi \cdot a \cdot \eta_0 \cdot N}$$

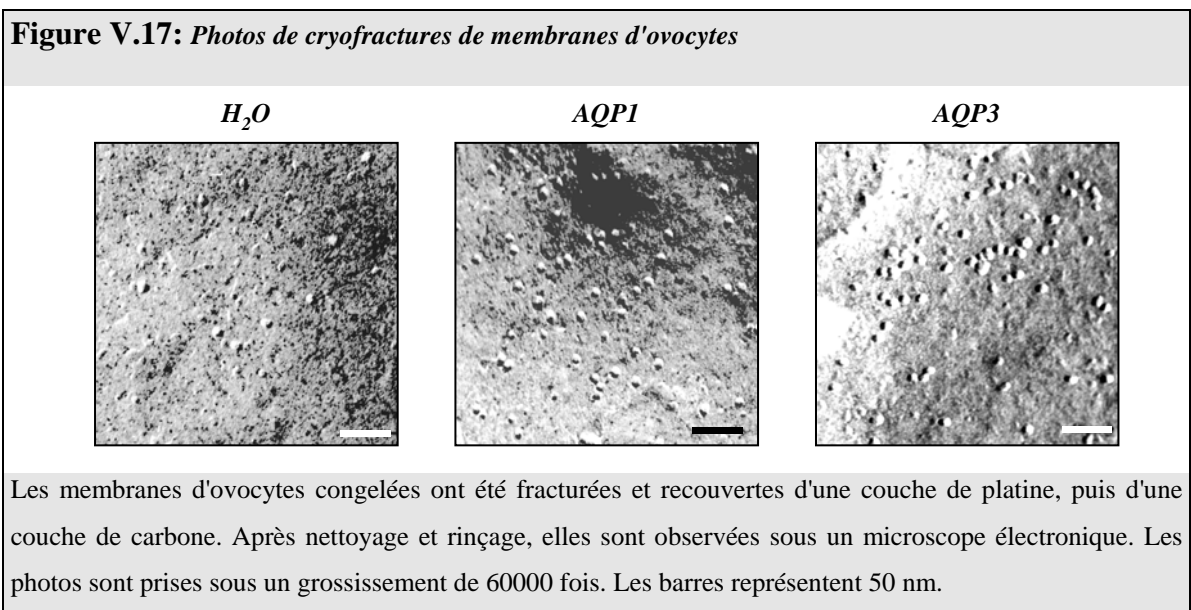
avec S: coefficient de sédimentation, M: Poids moléculaire, v: volume spécifique partiel de la particule, ρ: densité du solvant, a: rayon de Stokes, η₀: viscosité du solvant et N: nombre d'Avogadro.

Nous avons donc entrepris la comparaison des particules intramembraires sur cryofracture de membranes d'ovocytes exprimant AQP1 et AQP3 grâce à la microscopie électronique.

V.C.4. Observation des particules intramembranaires des membranes d'ovocytes de xénope exprimant AQP3

V.C.4.a Calcul de la densité de particules

La figure ci-dessous montre la face P des cryofractures de membranes d'ovocytes injectés à l'eau, avec AQP1 ou avec AQP3.



Le calcul de la perméabilité unitaire d'un canal hydrique exprimé dans un système peut se calculer à partir de la valeur de la perméabilité hydrique membranaire globale du système et de la densité de ces canaux présents sur la surface membranaire.

Nous avons mesurer la densité des particules exprimées sur la surface d'ovocytes témoins, injectés à l'eau, et sur la surface d'ovocytes exprimant AQP1 et AQP3, 72 heures après l'injection de 10 ng d'ARNc. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau V.1: Densités des particules observées sur la surface des ovocytes

	Densité des particules (nombre/ μm^2)
Ovocytes H ₂ O	181 \pm 40
Ovocytes AQP1	723 \pm 165
Ovocytes AQP3	406 \pm 76

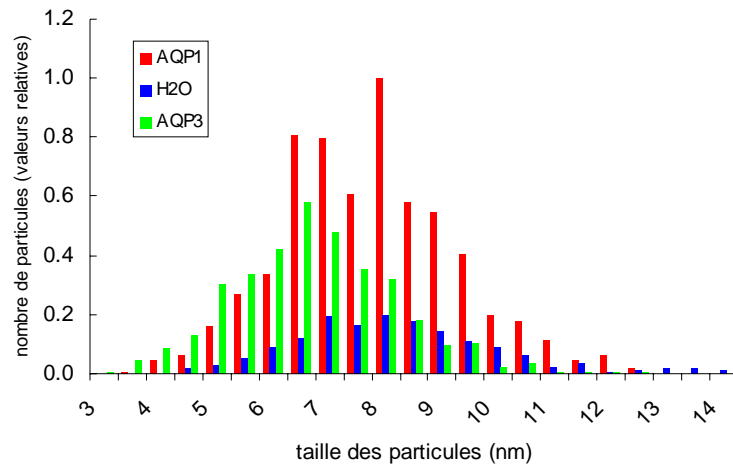
Le nombre de particules (entre 8000 et 10000) a été compté sur plusieurs photos sur une surface de valeur connue (μm^2). Une moyenne de la densité des particules (nombre de particules/ μm^2) a été calculée ainsi que l'écart-type.

Les valeurs obtenues montrent que la densité de particules endogènes de l'ovocyte de xénope est d'environ 181 particules par μm^2 , elle est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature. Nous en déduisons que la densité de particules AQP1 est de 542/ μm^2 et celle d'AQP3 est de 225/ μm^2 , à condition que l'expression des canaux hydriques exogènes n'induisse pas l'expression de protéines membranaires endogènes.

V.C.4.b Calcul du diamètre des particules

Nous avons mesuré la taille des particules observées à la surface des ovocytes injectés à l'eau (particules endogènes) et injectés avec AQP1 et AQP3 (particules endogènes + AQP1 (ou AQP3)). Le graphe ci-dessous représente la taille des particules mesurée en relation avec la fréquence rencontrée ramenée à 1 pour la fréquence la plus élevée (observée pour les ovocytes AQP1 montrant des particules d'environ 8 nm).

Figure V.18: Mesure des tailles des particules en relation avec leur fréquence



Pour le calcul des tailles des particules ont été mesurées, 597, 786 et 752 particules sur des ovocytes injectés respectivement avec H₂O, AQP1 et AQP3.

Les résultats montrent que la taille majoritaire des particules observées sur des ovocytes témoins injectés à l'eau est d'environ 8 nm et sont en accord avec ceux de la littérature (Eskandari *et al.*, 1998; Zampighi *et al.*, 1995). Les ovocytes exprimant AQP1 présentent deux tailles majoritaires de particules intramembranaires, des particules de taille 8 nm qui pourraient correspondre aux particules endogènes (dont la quantité est plus importante que sur la surface des ovocytes témoins injectés à l'eau), et des particules de taille 6,5 à 7 nm, qui pourraient correspondre à AQP1. Les ovocytes exprimant AQP3 montrent des particules d'une taille de 7 nm environ. Ces résultats montrent qu'il n'y aurait pas de différence significative de taille entre AQP1 et AQP3, suggérant qu'AQP3 aurait la même organisation membranaire.

V.D. DISCUSSION-CONCLUSION

Nous avons cherché à déterminer l'état d'oligomérisation d'AQP3 dans différentes membranes. Les membranes d'ovocytes de xénope expriment une AQP3 fonctionnelle et glycosylée, bien adressée à la membrane plasmique de l'ovocyte. En revanche, la levure exprime une AQP3 non glycosylée, dont nous n'avons pas pu mettre en évidence la fonction, sans doute parce qu'elle n'est pas adressée à la membrane plasmique de la levure.

Le profil d'AQP3 isolée des membranes (excepté des membranes de levure) se présente sous une forme monomérique et dimérique glycosylées (voir l'expérience de déglycosylation). La forme dimérique est difficilement dissociable par le SDS (2,5%), par le DTT (8,5 mM), ou par 100 mM de β -ME contenus dans le tampon de charge ou dans le tampon de déglycosylation. Ce dimère est encore visible après déglycosylation, suggérant que la glycosylation n'est pas impliquée dans la stabilité du dimère, comme l'avait suggéré certains auteurs pour AQP1 (Schulte et van Hoek, 1997; van Hoek *et al.*, 1995). Le SDS, détergent anionique, doit avoir difficilement accès aux résidus basiques probablement enfouis et les agents réducteurs hydrophiles (DTT et β -ME) n'ont sans doute pas accès aux cystéines (peut-être situées dans des régions hydrophobes) qui pourraient être impliquées dans la formation de ponts disulfures entre deux monomères. La résistance au SDS a déjà été montré pour les tétramères d'AQP1 (Denker *et al.*, 1988) et d'AQPZ (Borgnia *et al.*, 1999).

D'autres protéines membranaires autres que les protéines MIPs sont très stables dans le SDS. Par exemple, le canal potassique SKC1 de *Streptomyces lividans*, composé de quatre sous-unités identiques, migre sous des formes monomériques et tétramériques en présence de SDS (Cortes et Perozo, 1997; Heginbotham *et al.*, 1997). Une transition oligomère-monomère se produit à une température de chauffage supérieure à 70°C. Une stabilité de l'oligomérisation a aussi été observée pour la glycophorine A, présente dans les membranes d'érythrocytes: les formes dimériques sont stables en SDS, du fait d'un contact étroit spécifique entre hélices au niveau de la bicouche lipidique par des liaisons de Van

Der Waals, ces régions de contact contiennent des résidus riches en carbones β (V, I, T, L) (MacKenzie *et al.*, 1997).

Une équipe a récemment montré que deux cystéines en N-terminal ont été identifiées dans le récepteur humain du calcium comme étant impliquées dans la dimérisation (Ray *et al.*, 1999). Six cystéines sont situées dans la séquence protéique d'AQP3 de rat: C11, dans l'extrémité N-terminale, C29 et C39, dans le premier segment transmembranaire, C91, dans la boucle B, C174, dans le quatrième segment transmembranaire, et C267, dans l'extrémité C-terminale. Il a été démontré que certaines protéines composées de plusieurs sous-unités étaient reliées entre elles par des interactions au niveau des extrémités N- (Kreusch *et al.*, 1998), ou C-terminales (Daram *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1997). Les séquences N et C-terminales d'AQP3 sont très hydrophiles et si un pont disulfure inter-moléculaire implique les cystéine 11 ou 267, les agents réducteurs devraient facilement y avoir accès. On peut imaginer cependant que l'association des sous-unités par ces extrémités conduise à la formation d'une région hydrophobe, difficilement accessible. Le profil d'hydrophobicité d'AQP3 montre que la boucle B est très hydrophobe, la cystéine 91 est aussi un bon candidat pour être impliquée dans un pont disulfure qui peut difficilement être réduit. Les cystéines situées dans les segments transmembranaires peuvent aussi avoir leur rôle puisqu'on peut observer dans les structures tridimensionnelles que des contacts étroits ont lieu entre les segments transmembranaires des sous-unités adjacentes.

Par contre, une équipe travaillant sur les canaux sodiques a mis en évidence l'implication de deux cystéines qui ne seraient pas impliquées dans l'assemblage des sous-unités mais dans le transport à la membrane plasmique du canal assemblé (Firsov *et al.*, 1999).

L'analyse en immunoblot des fractions des gradients de sédimentation a montré qu'il était impossible de calculer avec précision le coefficient de sédimentation d'AQP3 en conditions non-dénaturantes. Nous nous sommes affranchis des variations liées à la reproductibilité des gradients de sédimentation, aux détergents utilisés et à la composition lipidique de la membrane, en focalisant notre travail sur les membranes de globules rouges et en comparant les positions d'AQP1 et d'AQP3 de ces membranes. Dans ce cas, l'analyse reste encore soumise aux variations dues à la quantité de détergent liée et à la

glycosylation. Cependant, ces variations ne suffisent pas à expliquer ce grand décalage dans la position d'AQP1 et d'AQP3 en conditions non-dénaturantes. La forme tétramérique d'AQP1 est confirmée, et n'est pas dissociée en conditions non-dénaturantes. Les résultats obtenus sur AQP3 conduisent à deux hypothèses:

- AQP3 est dans un état initial tétramérique dans les membranes, mais la protéine est très sensible aux détergents non dénaturants utilisés, elle s'est donc dissociée,

- AQP3 est dans un état monomérique et dimérique dans les membranes.

Dans le but d'opter pour l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, des études en microscopie électronique sur cryofractures de membranes d'ovocytes ont été réalisées. Nous montrons qu'il n'y a pas de différence significative entre les tailles des particules intramembranaires observées sur les ovocytes exprimant AQP3 par rapport à ceux exprimant AQP1, suggérant qu'AQP3 est sous forme tétramérique dans les membranes. Ce résultat est tout de même à prendre avec précautions car nous avons vu dans le chapitre II.B.7 de l'introduction, que le diamètre calculé des particules intramembranaires fluctue facilement pour une même protéine, en fonction de la technique d'ombrage et de la méthode de calcul utilisées.

Les **procédés chromatographiques** en vue de la purification de protéines membranaires ont montré l'état d'oligomérisation de certains canaux hydriques solubilisés en conditions non-dénaturantes à la sortie des colonnes, mais les résultats n'aboutissent pas toujours à la même conclusion. En effet, **AQP1** est trouvée tétramérique en Triton (Smith et Agre, 1991), et dimérique en OG (Jarvis et Louis, 1995; Schulte et van Hoek, 1997; Van Hoek *et al.*, 1993; van Hoek *et al.*, 1995), et **AQP0**, en OG, est trouvée tétramérique pour les uns (Aerts *et al.*, 1990; Jarvis et Louis, 1995; Van Hoek *et al.*, 1993), et monomérique ou dimérique pour les autres (Manenti *et al.*, 1988). Ces résultats montrent que la détermination de l'état d'oligomérisation d'une protéine membranaire après passage sur colonne n'est pas toujours concluante.

L'observation des **cartes de projection 2D ou 3D** réalisées à partir de cristaux, ont montré l'organisation tétramérique de certains canaux hydriques (**AQP0**, **AQP1**, **AQPcic**,

AQPZ). Ces observations ont été confirmées pour certains d'entre eux par des expériences de **sédimentation sur gradient de saccharose**: c'est le cas d'**AQP1** solubilisée en Triton (Jung *et al.*, 1994b; Smith et Agre, 1991) et en NLS (Mathai et Agre, 1999), d'**AQPcic** en Triton et en OG (Lagree *et al.*, 1998a), et d'**AQPZ** en DM (Borgnia *et al.*, 1999), mais les expériences n'ont pas été effectuées pour AQP0. A l'inverse, la sédimentation sur gradient de saccharose a été effectuée pour des protéines MIPs dont les cartes de projection n'ont pas été déterminées, c'est le cas d'**AQP2** en déoxycholate (Kamsteeg *et al.*, 1999), d'**AQP3** en OG, Triton et NLS (le travail présenté ici), d'**AQP4** en déoxycholate (Neely *et al.*, 1999) et de **GlpF** en OG et Triton (Lagree *et al.*, 1999; Lagree *et al.*, 1998a). Les résultats ont montré que les aquaporines AQP2 et AQP4 sédimentent dans des fractions correspondant à un coefficient de sédimentation en accord avec une forme tétramérique. En revanche, AQP3 et GlpF sédimentent dans des fractions plus légères en accord avec une forme monomérique pour GlpF, et monomérique et dimérique pour AQP3. Ces résultats ne nous indiquent cependant pas si ces protéines sont organisées en tétramères dans la membrane et l'obtention de cartes de projection sur des cristaux de ces protéines, parallèlement aux observations des cryofractures de membranes, devraient permettre de répondre à cette question. Si AQP3 et GlpF sont tétramériques dans les membranes, alors il existerait peut-être un lien entre la sensibilité du tétramère aux détergents non-dénaturants des aquaglycéroporines et des transporteurs de glycérol, et leur capacité à transporter les petits solutés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail décrit dans cette thèse a consisté à approfondir nos connaissances sur les relations structure-fonction des protéines MIPs. Ces protéines sont connues depuis peu et elles ont un rôle très important puisqu'elles sont impliquées dans les processus de régulation de l'équilibre osmotique des cellules. Elles sont notamment abondantes dans le rein où elles interviennent dans la réabsorption de l'eau, et la mutation de l'une d'entre elles, AQP2, entraîne un diabète néphrogénique insipide. La fonction principale de ces protéines chez les mammifères est de transporter l'eau, mais certaines d'entre elles sont également capables de transporter les petits solutés, c'est le cas des aquaglycéroporines.

La plupart des études ont été menées sur AQP1, mais peu d'études ont été effectuées sur AQP3 qui est pourtant la première aquaglycéroporine clonée chez les mammifères. Sa caractérisation structurale et fonctionnelle permettrait pourtant de comprendre les phénomènes de sélectivité. Nous nous sommes donc investis dans l'étude d'AQP3.

Nous avons vu que les travaux réalisés dans divers systèmes, présentés dans cette thèse et décrits par différents auteurs, dans le but de déterminer la mise en commun ou non du pore d'AQP3 pour l'eau et le glycérol (mesure du coefficient de réflexion pour certains solutés, inhibition des transport d'eau et de glycérol, mesures fonctionnelles de mutants et de chimères, effet du pH sur la fonction), n'ont pas permis d'aboutir à une conclusion identique. Nous avons proposé une hypothèse ou une partie seulement du pore est commune. Ce modèle est à prendre avec précautions mais il pourrait servir éventuellement d'outil de base pour envisager de nouvelles expériences.

Nous avons mis en évidence la présence d'AQP3 dans la membrane du globule rouge. La purification d'AQP3 à partir de ces membranes aurait pu être envisagée en vue d'études cristallographiques mais elle semble moins exprimée par rapport à AQP1 dans ces membranes. En revanche, les études fonctionnelle et biochimique d'AQP3 sur ce tissu sont facilement réalisables puisqu'il est aisé d'obtenir des globules rouges.

Nous avons observé une forte stabilité du dimère d'AQP3 qui est résistant au SDS et aux agents réducteurs. Des études de mutagenèse dirigées sur les cystéines d'AQP3

devraient permettre de déterminer les cystéines impliquées dans d'éventuels ponts disulfures intermoléculaires.

C'est grâce à l'utilisation des globules rouges, possédant AQP1 et AQP3 dans leur membrane, que nous avons pu observer une différence dans la sensibilité aux détergents non-dénaturants de ces deux protéines. AQP1 dévoile son état tétramérique mais AQP3 apparaît monomérique et dimérique. Nous n'avons donc pas pu conclure quant à l'état d'oligomérisation d'AQP3 puisqu'il ne faut pas écarter la possibilité d'une sensibilité plus importante d'AQP3, de GlpF, et généralement peut-être à toutes les aquaglycéroporines et aux facilitateurs de glycérol, aux détergents non-dénaturants. D'ailleurs, l'observation des cryofractures de membranes d'ovocytes exprimant AQP1 et AQP3 a montré que la taille d'AQP3 n'est pas significativement différente de celle d'AQP1, suggérant une structure tétramérique. L'étude cristallographique d'AQP3 purifiée à partir de son expression dans la levure devrait permettre de confirmer ce résultat.

L'ovocyte de xénope est un système d'expression souvent utilisé pour déterminer la fonction de protéines membranaires. Nous avons montré qu'il existait un transport d'eau et de glycérol endogène dans la membrane de l'ovocyte de xénope à certains stades de maturation, il est donc important de sélectionner les ovocytes matures ou éventuellement de s'affranchir de ce transport endogène en incubant les ovocytes préalablement avec de la progestérone avant toute expérience de transport. Il serait intéressant de cloner ce ou ces transporteurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abrami, L., Berthoud, V., Deen, P.M., Rousselet, G., Tacnet, F. et Ripoche, P.** (1996).
Glycerol permeability of mutant aquaporin 1 and other AQP-MIP proteins: inhibition studies.
Pflugers Arch **431**, 408-414.
2. **Abrami, L., Capurro, C., Ibarra, C., Parisi, M., Buhler, J.M. et Ripoche, P.** (1995a).
Distribution of mRNA encoding the FA-CHIP water channel in amphibian tissues: effects of salt adaptation.
J Membr Biol **143**, 199-205.
3. **Abrami, L., Simon, M., Rousselet, G., Berthoud, V., Buhler, J.M. et Ripoche, P.** (1994).
Sequence and functional expression of an amphibian water channel, FA-CHIP: a new member of the MIP family.
Biochim Biophys Acta **1192**, 147-151.
4. **Abrami, L., Tacnet, F. et Ripoche, P.** (1995b).
Evidence for a glycerol pathway through aquaporin 1 (CHIP28) channels.
Pflugers Arch. **430**, 447-458.
5. **Aerts, T., Xia, J.Z., Slegers, H., de Block, J. et Clauwaert, J.** (1990).
Hydrodynamic characterization of the major intrinsic protein from the bovine lens fiber membranes. Extraction in n-octyl-beta-D- glucopyranoside and evidence for a tetrameric structure.
J Biol Chem **265**, 8675-8680.
6. **Agre, P., Lee, M.D., Devidas, S. et Guggino, W.B.** (1997).
Aquaporins and ion conductance.
Science **275**, 1490.
7. **Agre, P., Saboori, A.M., Asimos, A. et Smith, B.L.** (1987).
Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen.
J Biol Chem **262**, 17497-17503.
8. **André, B.** (1995).
An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast **11**, 1575-1611.
9. **Bai, L., Fushimi, K., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1996).
Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel.
J Biol Chem **271**, 5171-5176.
10. **Barone, L.M., Shih, C. et Wasserman, B.P.** (1997).
Mercury-induced conformational changes and identification of conserved surface loops in plasma membrane aquaporins from higher plants. Topology of PMIP31 from *Beta vulgaris* L.
J Biol Chem **272**, 30672-30677.
11. **Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. et Marty, F.** (1999).
Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells.
Planta **209**, 77-86.

12. **Baumgarten, R., Van De Pol, M.H., Wetzels, J.F., Van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1998).
Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells.
J Am Soc Nephrol **9**, 1553-1559.
13. **Beuron, F., Le Caherec, F., Guillam, M.T., Cavalier, A., Garret, A., Tassan, J.P., Delamarche, C., Schultz, P., Mallouh, V., Rolland, J.P. et al.** (1995).
Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*.
J Biol Chem **270**, 17414-17422.
14. **Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R. et Kaldenhoff, R.** (1999).
The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol.
Plant J **18**, 565-570.
15. **Bluemink, J.G., Hage, W.J., van den Hoef, M.H. et Dictus, W.J.** (1983).
Freeze-fracture electron microscopy of membrane changes in progesterone- induced maturing oocytes and eggs of *Xenopus laevis*.
Eur J Cell Biol **31**, 85-93.
16. **Bonhivers, M., Carbrey, J.M., Gould, S.J. et Agre, P.** (1998).
Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains.
J Biol Chem **273**, 27565-27572.
17. **Borgnia, M.J., Kozono, D., Calamita, G., Maloney, P.C. et Agre, P.** (1999).
Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein.
J Mol Biol **291**, 1169-1179.
18. **Calamita, G., Bishai, W.R., Preston, G.M., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1995).
Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*.
J Biol Chem **270**, 29063-29066.
19. **Canfield, M.C., Tamarappoo, B.K., Moses, A.M., Verkman, A.S. et Holtzman, E.J.** (1997).
Identification and characterization of aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with partial vasopressin response.
Hum Mol Genet **6**, 1865-1871.
20. **Carlsen, A. et Wieth, J.O.** (1976).
Glycerol transport in human red cells.
Acta Physiol. Scand. **97**, 501-513.
21. **Chandy, G., Zampighi, G.A., Kreman, M. et Hall, J.E.** (1997).
Comparison of the water transporting properties of MIP and AQP1.
J Membr Biol **159**, 29-39.
22. **Chen, P.Y., Pearce, D. et Verkman, A.S.** (1988).
Membrane water and solute permeability determined quantitatively by self-quenching of an entrapped fluorophore.
Biochemistry **27**, 5713-5718.
23. **Chen, P.Y. et Verkman, A.S.** (1987).
Non-electrolyte transport across renal proximal tubule cell membranes measured by tracer efflux and light scattering.
Pflugers Arch **408**, 491-496.
24. **Cheng, A., van Hoek, A.N., Yeager, M., Verkman, A.S. et Mitra, A.K.** (1997).
Three-dimensional organization of a human water channel.

Nature **387**, 627-630.

25. **Chrispeels, M.J., Crawford, N.M. et Schroeder, J.I.** (1999).

Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells.

Plant Cell **11**, 661-676.

26. **Cooper, G.J. et Boron, W.F.** (1998).

Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant.

Am J Physiol **275**, C1481-1486.

27. **Cortes, D.M. et Perozo, E.** (1997).

Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability.

Biochemistry **36**, 10343-10352.

28. **Coury, L.A., Mathai, J.C., Prasad, G.V., Brodsky, J.L., Agre, P. et Zeidel, M.L.** (1998).

Reconstitution of water channel function of aquaporins 1 and 2 by expression in yeast secretory vesicles.

Am J Physiol **274**, F34-42.

29. **Daniels, M.J., Chaumont, F., Mirkov, T.E. et Chrispeels, M.J.** (1996).

Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site.

Plant Cell **8**, 587-599.

30. **Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H. et Cherel, I.** (1997).

Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C- terminal cytoplasmic domain.

Embo J **16**, 3455-3463.

31. **Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L. et Roberts, D.M.** (1999).

Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties.

Biochemistry **38**, 347-353.

32. **Deen, P.M., Croes, H., van Aubel, R.A., Ginsel, L.A. et van Os, C.H.** (1995).

Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing.

J Clin Invest **95**, 2291-2296.

33. **Deen, P.M., Verdijk, M.A., Knoers, N.V., Wieringa, B., Monnens, L.A., van Os, C.H. et van Oost, B.A.** (1994).

Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine.

Science **264**, 92-95.

34. **Deen, P.M.T., Dempster, J.A., Wieringa, B. et Van Os, C.H.** (1992).

Isolation of a cDNA for rat CHIP28 water channel: high mRNA expression in kidney cortex and inner medulla.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **188**, 1267-1273.

35. **Denker, B.M., Smith, B.L., Kuhadja, F.P. et Agre, P.** (1988).

Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules.

J. Biol. Chem. **263**, 15634-15642.

36. **Dermietzel, R.** (1973).

Visualization by freeze-fracturing of regular structures in glial cell membranes.

Naturwissenschaften **60**, 208.

37. **Dilsiz, N. et Crabbe, M.J.** (1995).

- Heterologous expression in *Escherichia coli* of native and mutant forms of the major intrinsic protein of rat eye lens (MIP26).
Biochem J **305**, 753-759.
38. **Ecelbarger, C.A., Terris, J., Frindt, G., Echevarria, M., Marples, D., Nielsen, S. et Knepper, M.A.** (1995).
Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney.
Am. J. Physiol. **269**, F663-F672.
39. **Echevarria, M., Windhager, E.E. et Frindt, G.** (1996).
Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3.
J. Biol. Chem. **271**, 25079-25082.
40. **Echevarria, M., Windhager, E.E., Tate, S.S. et Frindt, G.** (1994).
Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**, 10997-11001.
41. **Ehring, G.R., Lagos, N., Zampighi, G.A. et Hall, J.E.** (1992).
Phosphorylation modulates the voltage dependence of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes.
J Membr Biol **126**, 75-88.
42. **Ehring, G.R., Zampighi, G., Horwitz, J., Bok, D. et Hall, J.E.** (1990).
Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes.
J. Gen. Physiol. **96**, 631-664.
43. **Eskandari, S., Wright, E.M., Kreman, M., Starace, D.M. et Zampighi, G.A.** (1998).
Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze- fracture electron microscopy.
Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 11235-11240.
44. **Firsov, D., Robert-Nicoud, M., Gruender, S., Schild, L. et Rossier, B.C.** (1999).
Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelium sodium channel (ENaC). Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface.
J Biol Chem **274**, 2743-2749.
45. **Fischbarg, J., Kuang, K., Hirsch, J., Lecuona, S., Rogozinski, L., Silverstein, S.C. et Loike, J.** (1989).
Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages.
Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **86**, 8397-8401.
46. **Fischbarg, J., Kuang, K., Vera, J.C., Arant, S., Silverstein, S.C., Loike, J. et Rosen, O.M.** (1990).
Glucose transporters serve as water channels.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **87**, 3244-3247.
47. **Fischbarg, J., Li, J., Cheung, M., Czegledy, F., Iserovich, P. et Kuang, K.** (1995).
Predictive evidence for a porin-type beta-barrel fold in CHIP28 and other members of the MIP family. A restricted-pore model common to water channels and facilitators.
J Membr Biol **143**, 177-188.
48. **Folkesson, H.G., Matthay, M.A., Hasegawa, H., Kheradmand, F. et Verkman, A.S.** (1994).
Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 4970-4974.
49. **Ford, P., Amodeo, G., Capurro, C., Ibarra, C., Dorr, R., Ripoche, P. et Parisi, M.** (1996).
Progesterone inhibition of water permeability in *Bufo arenarum* oocytes and urinary bladder.
Am J Physiol **270**, F880-885.

50. **Franki, N., Macaluso, F., Schubert, W., Gunther, L. et Hays, R.M.** (1995).
Water channel-carrying vesicles in the rat IMCD contain cellubrevin.
Am J Physiol **269**, C797-801.
51. **Frigeri, A., Gropper, M.A., Turck, C.W. et Verkman, A.S.** (1995).
Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**, 4328-4331.
52. **Frigeri, A., Nicchia, G.P., Verbavatz, J.M., Valenti, G. et Svelto, M.** (1998).
Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle.
J Clin Invest **102**, 695-703.
53. **Froger, A., Tallur, B., Thomas, D. et Delamarche, C.** (1998).
Prediction of functional residues in water channels and related proteins.
Protein Sci **7**, 1458-1468.
54. **Fushimi, K., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1997).
Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel.
J Biol Chem **272**, 14800-14804.
55. **Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1993).
Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule.
Nature **361**, 549-552.
56. **Gerbeau, P., Gu lu, J., Ripoche, P. et Maurel, C.** (1999).
Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes.
Plant J **18**, 577-587.
57. **Girsh, S.J. et Perrachia, C.** (1985).
Lens cell-to-cell channel protein:
I. Self-assembly into liposomes and permeability regulation by calmodulin.
J. Membrane Biol. **83**, 217-225.
58. **Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. et Oliver, S.G.** (1996).
Life with 6000 genes.
Science **274**, 546, 563-547.
59. **Goji, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Matsuo, M., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1998).
Novel mutations in aquaporin-2 gene in female siblings with nephrogenic diabetes insipidus: evidence of disrupted water channel function.
J Clin Endocrinol Metab **83**, 3205-3209.
60. **Gorin, M.B., Yancey, S.B., Cline, J., Revel, J.P. et Horwitz, J.** (1984).
The major intrinsic protein (MIP) of the bovin lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning.
Cell **39**, 49-59.
61. **Gustafson, C.E., Levine, S., Katsura, T., McLaughlin, M., Aleixo, M.D., Tamarappoo, B.K., Verkman, A.S. et Brown, D.** (1998).
Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein- aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells.
Histochem Cell Biol **110**, 377-386.

62. **Han, Z., Wax, M.B. et Patil, R.V.** (1998).
Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation.
J Biol Chem **273**, 6001-6004.
63. **Hasegawa, H., Ma, T., Skach, W., Matthay, M.A. et Verkman, A.S.** (1994).
Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues.
J Biol Chem **269**, 5497-5500.
64. **Hasegawa, H., Skach, W., Baker, O., Calayag, M.C., Lingappa, V. et Verkman, A.S.** (1992).
A multifunctional aqueous channel formed by CFTR.
Science **258**, 1477-1479.
65. **Hasler, L., Walz, T., Tittmann, P., Gross, H., Kistler, J. et Engel, A.** (1998).
Purified lens major intrinsic protein (MIP) forms highly ordered tetragonal two-dimensional arrays by reconstitution.
J Mol Biol **279**, 855-864.
66. **Heginbotham, L., Odessey, E. et Miller, C.** (1997).
Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel.
Biochemistry **36**, 10335-10342.
67. **Heller, K., Lin, E. et Wilson, T.** (1980).
Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **144**, 274-278.
68. **Heymann, J.B. et Engel, A.** (1999).
Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels.
News Physiol. Sci. **14**, 187-194.
69. **Hochberg, Z., Van Lieburg, A., Even, L., Brenner, B., Lanir, N., Van Oost, B.A. et Knoers, N.V.** (1997).
Autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin-2 mutation.
J Clin Endocrinol Metab **82**, 686-689.
70. **Huang, P., Stroffekova, K., Cuppoletti, J., Mahanty, S.K. et Scarborough, G.A.** (1996).
Functional expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast.
Biochim Biophys Acta **1281**, 80-90.
71. **Humbert, F., Pricam, C., Perrelet, A. et Orci, L.** (1975).
Specific plasma membrane differentiations in the cells of the kidney collecting tubule.
J Ultrastruct Res **52**, 13-20.
72. **Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1997a).
Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea.
J. Biol. Chem. **272**, 20782-20786.
73. **Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1998a).
Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol.
Biochem Biophys Res Commun **244**, 268-274.
74. **Ishibashi, K., Kuwahara, M., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1997b).
Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **237**, 714-718.

75. **Ishibashi, K. et Sasaki, S.** (1998).
The dichotomy of MIP family suggests two separate origins of water channels.
News Physiol. Sci. **13**, 137-142.
76. **Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T. et Marumo, F.** (1994).
Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**, 6269-6273.
77. **Ishibashi, K., Sasaki, S., Saito, F., Ikeuchi, T. et Marumo, F.** (1995).
Structure and chromosomal localization of a human water channel (AQP3) gene.
Genomics **27**, 352-354.
78. **Ishibashi, K., Yamauchi, K., Kageyama, Y., Saito-Ohara, F., Ikeuchi, T., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1998b).
Molecular characterization of human Aquaporin-7 gene and its chromosomal mapping.
Biochim Biophys Acta **1399**, 62-66.
79. **Jap, B.K. et Li, H.** (1995).
Structure of the osmo-regulated H₂O-channel, AQP-CHIP, in projection at 3.5 Å resolution.
J Mol Biol **251**, 413-420.
80. **Jarvis, L.J. et Louis, C.F.** (1995).
Purification and oligomeric state of the major lens fiber cell membrane proteins.
Curr Eye Res **14**, 799-808.
81. **Jay, A.W.** (1975).
Geometry of the human erythrocyte: I. Effect of albumin on cell geometry.
Biophys. J. **15**, 205-222.
82. **Jenq, W., Mathieson, I.M., Ihara, W. et Ramirez, G.** (1998).
Aquaporin-1: an osmoinducible water channel in cultured mIMCD-3 cells.
Biochem Biophys Res Commun **245**, 804-809.
83. **Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C. et Kjellbom, P.** (1998).
Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation.
Plant Cell **10**, 451-459.
84. **Johnson, K.D., Hofte, H. et Chrispeels, M.J.** (1990).
An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF).
Plant Cell **2**, 525-532.
85. **Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M. et Agre, P.** (1994a).
Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 13052-13056.
86. **Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1994b).
Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model.
J Biol Chem **269**, 14648-14654.
87. **Kamsteeg, E.J., Wormhoudt, T.A., Rijss, J.P., van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1999).
An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus.
Embo J **18**, 2394-2400.

88. **Kasai, M., Kanemasa, T. et Fukumoto, S.** (1979).
Determination of reflection coefficients for various ions and neutral molecules in sarcoplasmic reticulum vesicles through osmotic volume change studied by stopped flow technique.
J Membr Biol **51**, 311-324.
89. **Katsura, T., Verbavatz, J.M., Farinas, J., Ma, T., Ausiello, D.A., Verkman, A.S. et Brown, D.** (1995).
Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A **92**, 7212-7216.
90. **King, L.S. et Agre, P.** (1996).
Pathophysiology of the aquaporin water channels.
Annu Rev Physiol **58**, 619-648.
91. **King, L.S., Nielsen, S. et Agre, P.** (1997).
Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat.
Am J Physiol **273**, C1541-1548.
92. **Ko, S.B., Uchida, S., Naruse, S., Kuwahara, M., Ishibashi, K., Marumo, F., Hayakawa, T. et Sasaki, S.** (1999).
Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver.
Biochem Mol Biol Int **47**, 309-318.
93. **Koyama, N., Ishibashi, K., Kuwahara, M., Inase, N., Ichioka, M., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1998).
Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene.
Genomics **54**, 169-172.
94. **Koyama, Y., Yamamoto, T., Kondo, D., Funaki, H., Yaoita, E., Kawasaki, K., Sato, N., Hatakeyama, K. et Kihara, I.** (1997).
Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver.
J Biol Chem **272**, 30329-30333.
95. **Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F. et Choe, S.** (1998).
Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel.
Nature **392**, 945-948.
96. **Kreutziger, G.O.** (1968).
Freeze-etching of intercellular junctions of mouse liver.
Proc. 26th Meeting of the Electron Microscopy Society of America , 234-235.
97. **Kuriyama, H., Kawamoto, S., Ishida, N., Ohno, I., Mita, S., Matsuzawa, Y., Matsubara, K. et Okubo, K.** (1997).
Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability.
Biochem Biophys Res Commun **241**, 53-58.
98. **Kushmerick, C., Varadaraj, K. et Mathias, R.T.** (1998).
Effects of lens major intrinsic protein on glycerol permeability and metabolism.
J Membr Biol **161**, 9-19.
99. **Kuwahara, M.** (1998).
Aquaporin-2, a vasopressin-sensitive water channel, and nephrogenic diabetes insipidus.
Intern Med **37**, 215-217.
100. **Kuwahara, M., Fushimi, K., Terada, Y., Bai, L., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1995).

cAmp-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes.

J Biol Chem **270**, 10384-10387.

101. **Kuwahara, M., Gu, Y., Ishibashi, K., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1997).

Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel.

Biochemistry **36**, 13973-13978.

102. **Kuwahara, M., Ishibashi, K., Fushimi, K., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1996).

Identification of mercury-sensitive residue in rat and human aquaporin-3 (abstract).

, 1269.

103. **Kuwahara, M., Ishibashi, K., Gu, Y., Terada, Y., Kohara, Y., Marumo, F. et Sasaki, S.** (1998).

A water channel of the nematode *C. elegans* and its implications for channel selectivity of MIP proteins.

Am J Physiol **275**, C1459-1464.

104. **Lacey, P.A., Robinson, J., Collins, M.L., Bailey, D.G., Evans, C.C., Moulds, J.J. et Daniels, G.L.** (1986).

Studies of the Co(a-b-) proposita and her family.

Transfusion **27**, 268-271.

105. **Lagree, V., Froger, A., Deschamps, S., Hubert, J.F., Delamarche, C., Bonnet, G., Thomas, D., Gouranton, J. et Pellerin, I.** (1999).

Switch from an aquaporin to a glycerol channel by two amino acids substitution.

J Biol Chem **274**, 6817-6819.

106. **Lagree, V., Froger, A., Deschamps, S., Pellerin, I., Delamarche, C., Bonnet, G., Gouranton, J., Thomas, D. et Hubert, J.F.** (1998a).

Oligomerization state of water channels and glycerol facilitators. Involvement Of loop e.

J Biol Chem **273**, 33949-33953.

107. **Lagree, V., Pellerin, I., Hubert, J.F., Tacnet, F., Le Caherec, F., Roudier, N., Thomas, D., Gouranton, J. et Deschamps, S.** (1998b).

A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in *xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes.

J Biol Chem **273**, 12422-12426.

108. **Laizé, V., Gobin, R., Rousselet, G., Badier, C., Hohmann, S., Ripoche, P. et Tacnet, F.** (1999).

Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the C-terminal domain.

Biochem Biophys Res Commun **257**, 139-144.

109. **Laizé, V., Rousselet, G., Verbavatz, J.M., Berthouaud, V., Gobin, R., Roudier, N., Abrami, L., Ripoche, P. et Tacnet, F.** (1995).

Functional expression of the human CHIP28 water channel in a yeast secretory mutant.

FEBS Lett. **373**, 269-274.

110. **Lanahan, A., Williams, J.B., Sanders, L.K. et Nathans, D.** (1992).

Growth factor-induced delayed early response gene.

Molecular and cellular biology **12**, 3919-3929.

111. **Lande, M.B., Jo, I., Zeidel, M.L., Somers, M. et Harris, H.W., Jr.** (1996).

Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water channel-containing vesicles.

J Biol Chem **271**, 5552-5557.

112. **Larabell, C.A. et Chandler, D.E.** (1988).

Freeze-fracture analysis of structural reorganization during meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*.

Cell Tissue Res **251**, 129-136.

113. **Lau, Y.T., Reynhout, J.K. et Horowitz, S.B.** (1994).

Membrane permeability changes during *Rana* oocyte maturation.

Experientia **50**, 606-609.

114. **Le Caherec, F., Deschamps, S., Delamarche, C., Pellerin, I., Bonnec, G., Guillam, M.T., Thomas, D., Gouranton, J. et Hubert, J.F.** (1996).

Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin functional comparison with aquaporin 1.

Eur J Biochem **241**, 707-715.

115. **Le Maire, M., Aggerbeck, L.P., Monteilhet, C., Andersen, J.P. et Moller, J.V.** (1986).

The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: a caution and a list of membrane proteins suitable as standards.

Anal Biochem **154**, 525-535.

116. **Lee, M.D., Bhakta, K.Y., Raina, S., Yonescu, R., Griffin, C.A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Preston, G.M. et Agre, P.** (1996).

The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization.

J Biol Chem **271**, 8599-8604.

117. **Li, H., Lee, S. et Jap, B.K.** (1997).

Molecular design of aquaporin-1 water channel as revealed by electron crystallography.

Nat Struct Biol **4**, 263-265.

118. **Li, J., Nielsen, S., Dai, Y., Lazowski, K.W., Christensen, E.I., Tabak, L.A. et Baum, B.J.** (1994).

Examination of rat salivary glands for the presence of the aquaporin CHIP.

Pflugers Arch **428**, 455-460.

119. **Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G. et Wright, E.M.** (1996).

Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter.

Proc Natl Acad Sci U S A **93**, 13367-13370.

120. **Ludwig, J., Owen, D. et Pongs, O.** (1997).

Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel.

Embo J **16**, 6337-6345.

121. **Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. et Hohmann, S.** (1994).

The FPS1 gene product functions as a glycerol facilitator in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Folia Microbiol Praha **39**, 534-536.

122. **Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. et Hohmann, S.** (1995).

Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress.

Embo J. **14**, 1360-1371.

123. **Ma, T., Frigeri, A., Hasegawa, H. et Verkman, A.S.** (1994).

Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene-sensitive glycerol transporter.

J. Biol. Chem. **269**, 21845-21849.

124. **Ma, T., Frigeri, A., Skach, W. et Verkman, A.S.** (1993a).

Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels.

Biochem Biophys Res Commun **197**, 654-659.

125. **Ma, T., Frigeri, A., Tsai, S.T., Verbavatz, J.M. et Verkman, A.S.** (1993b).
Localization and functional analysis of CHIP28k water channels in stably transfected Chinese hamster ovary cells.
J Biol Chem **268**, 22756-22764.
126. **Ma, T., Song, Y., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J. et Verkman, A.S.** (1999).
Defective Secretion of Saliva in Transgenic Mice Lacking Aquaporin-5 Water Channels.
J Biol Chem **274**, 20071-20074.
127. **Ma, T., Yang, B., Kuo, W.L. et Verkman, A.S.** (1996a).
cDna cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13.
Genomics **35**, 543-550.
128. **Ma, T., Yang, B. et Verkman, A.S.** (1996b).
cDna cloning of a functional water channel from toad urinary bladder epithelium.
Am J Physiol **271**, C1699-1704.
129. **Ma, T., Yang, B. et Verkman, A.S.** (1996c).
Gene structure, cDNA cloning, and expression of a mouse mercurial-insensitive water channel.
Genomics **33**, 382-388.
130. **Ma, T., Yang, B. et Verkman, A.S.** (1997).
Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart.
Biochem Biophys Res Commun **240**, 324-328.
131. **Ma, T., Yang, B. et Verkman, A.S.** (1998).
Generation of embryonic stem cell lines for targeted aquaporin-3 gene deletion (abstract).
J. Am. Soc. Nephrol. **9**, 22A.
132. **Macey, R.** (1984).
Transport of water and urea in red blood cells.
Am. J. Physiol. **246**, C195-C203.
133. **Macey, R.I. et Farmer, R.E.L.** (1970).
Inhibition of water and solute permeability in human red cells.
Biochim. Biophys. Acta **211**, 104-106.
134. **MacKenzie, K.R., Prestegard, J.H. et Engelman, D.M.** (1997).
A transmembrane helix dimer: structure and implications.
Science **276**, 131-133.
135. **Maller, J.L. et Krebs, E.G.** (1980).
Regulation of oocyte maturation.
Curr Top Cell Regul **16**, 271-311.
136. **Mandon, B., Chou, C.L., Nielsen, S. et Knepper, M.A.** (1996).
Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of rat renal collecting duct cells: possible role in aquaporin-2 trafficking.
J Clin Invest **98**, 906-913.
137. **Manenti, S., Dunia, I., le Maire, M. et Benedetti, E.L.** (1988).
High-performance liquid chromatography of the main polypeptide (MP26) of lens fiber plasma membranes solubilized with n-octyl beta-D- glucopyranoside.
FEBS Lett **233**, 148-152.

138. **Marinelli, R.A., Pham, L., Agre, P. et LaRusso, N.F.** (1997).
Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1.
J Biol Chem **272**, 12984-12988.
139. **Masui, Y. et Clarke, H.J.** (1979).
Oocyte maturation.
Int Rev Cytol **57**, 185-282.
140. **Mathai, J.C. et Agre, P.** (1999).
Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly.
Biochemistry **38**, 923-928.
141. **Mathai, J.C., Mori, S., Smith, B.L., Preston, G.M., Mohandas, N., Collins, M., van Zijl, P.C., Zeidel, M.L. et Agre, P.** (1996).
Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. The Colton-null phenotype.
J. Biol. Chem. **271**, 1309-1313.
142. **Maurel, C.** (1997).
Aquaporins and water permeability of plant membranes.
Annuv. Rev. Plant Mol. Biol. **48**, 399-429.
143. **Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J. et Chrispeels, M.J.** (1995).
Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP.
Embo J **14**, 3028-3035.
144. **Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I. et Chrispeels, M.J.** (1993).
The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes.
Embo J **12**, 2241-2247.
145. **Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I., Chrispeels, M.J. et Saier, M.H., Jr.** (1994).
Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes.
J. Biol. Chem. **269**, 11869-11872.
146. **Mazur, P., Leibo, S.P. et Miller, R.H.** (1974).
Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures.
J. Membr. Biol. **15**, 107-136.
147. **Meinild, A., Klaerke, D.A., Loo, D.D., Wright, E.M. et Zeuthen, T.** (1998a).
The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump.
J Physiol (Lond) **508**, 15-21.
148. **Meinild, A.K., Klaerke, D.A. et Zeuthen, T.** (1998b).
Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5.
J Biol Chem **273**, 32446-32451.
149. **Miao, G.H., Hong, Z. et Verma, D.P.** (1992).
Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane.
J Cell Biol **118**, 481-490.
150. **Mitra, A.K., van Hoek, A.N., Wiener, M.C., Verkman, A.S. et Yeager, M.** (1995).
The CHIP28 water channel visualized in ice by electron crystallography.
Nat Struct Biol **2**, 726-729.
151. **Mitra, A.K., Yeager, M., van Hoek, A.N., Wiener, M.C. et Verkman, A.S.** (1994).
Projection structure of the CHIP28 water channel in lipid bilayer membranes at 12-A resolution.

Biochemistry **33**, 12735-12740.

152. **Mlekoday, H.J., Moore, R. et Levitt, D.G.** (1983).

Osmotic water permeability of the human red cell. Dependence on direction of water flow and cell volume.
J Gen Physiol **81**, 213-220.

153. **Mulders, S.M., Bichet, D.G., Rijss, J.P., Kamsteeg, E.J., Arthus, M.F., Lonergan, M., Fujiwara, M., Morgan, K., Leijendekker, R., van der Sluijs, P., van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1998a).

An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex.
J Clin Invest **102**, 57-66.

154. **Mulders, S.M., Knoers, N.V., Van Lieburg, A.F., Monnens, L.A., Leumann, E., Wuhl, E., Schober, E., Rijss, J.P., Van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1997a).

New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels.
J Am Soc Nephrol **8**, 242-248.

155. **Mulders, S.M., Preston, G.M., Deen, P.M., Guggino, W.B., van Os, C.H. et Agre, P.** (1995).

Water channel properties of major intrinsic protein of lens.
J Biol Chem **270**, 9010-9016.

156. **Mulders, S.M., Rijss, J.P., Hartog, A., Bindels, R.J., van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1997b).

Importance of the mercury-sensitive cysteine on function and routing of AQP1 and AQP2 in oocytes.
Am J Physiol **273**, F451-456.

157. **Mulders, S.M., van der Kemp, A.J., Terlouw, S.A., van Boxtel, H.A.F., van Os, C.H. et Deen, P.M.T.** (1998b).

The exchange of functional domains among aquaporins with different transport characteristics.
Pflugers Arch **436**, 599-607.

158. **Nakhoul, N.L., Davis, B.A., Romero, M.F. et Boron, W.F.** (1998).

Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes [see comments].
Am J Physiol **274**, C543-548.

159. **Neely, J.D., Christensen, B.M., Nielsen, S. et Agre, P.** (1999).

Heterotetrameric Composition of Aquaporin-4 Water Channels.
Biochemistry **38**, 11156-11163.

160. **Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I. et Agre, P.** (1993).

Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**, 7275-7279.

161. **Ojcius, D.M., Toon, M.R. et Solomon, A.K.** (1988).

Is an intact cytoskeleton required for red cell urea and water transport ?
Biochim. Biophys. Acta **944**, 19-28.

162. **Oksche, A., Moller, A., Dickson, J., Rosendahl, W., Rascher, W., Bichet, D.G. et Rosenthal, W.** (1996).

Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor genes in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus.
Hum Genet **98**, 587-589.

163. **Pao, G.M., Wu, L.F., Johson, K.D., Hofte, H., Chrispels, M.J., Sweet, G., Sandal, N.N. et Saer, M.H.J.** (1991).

Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins.

Molecular Microbiol. **5**, 33-37.

164. **Park, J.H. et Saier, M.H., Jr.** (1996).

Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins.

J Membr Biol **153**, 171-180.

165. **Patil, R.V., Han, Z. et Wax, M.B.** (1997).

Regulation of water channel activity of aquaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide.

Biochem Biophys Res Commun **238**, 392-396.

166. **Pearson, R.B. et Kemp, B.E.** (1991).

Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations.

Methods Enzymol **200**, 62-81.

167. **Pennequin, P., Schorderet-Slatkine, S., Drury, K.C. et Baulieu, E.E.** (1975).

Decreased uptake of (3H)leucine during progesterone induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes.

FEBS Lett **51**, 156-160.

168. **Peracchia, C. et Girsch, S.J.** (1989).

Calmodulin site at the C-terminus of the putative lens gap junction protein MIP26.

Lens Eye Toxic Res **6**, 613-621.

169. **Pisano, M.M. et Chepelinsky, A.B.** (1991).

Genomic cloning, complete nucleotide sequence, and structure of the human gene encoding the major intrinsic protein (MIP) of the lens.

Genomics **11**, 981-990.

170. **Prasad, G.V.R., Coury, L.A., Finn, F. et Zeidel, M.L.** (1998).

Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO₂ across membranes.

J Biol Chem **273**, 33123-33126.

171. **Pratz, J., Ripoche, P. et Corman, B.** (1986).

Evidence for proteic water pathways in the luminal membrane of kidney proximal tubule.

Biochim. Biophys. acta **856**, 259-266.

172. **Preston, G.M. et Agre, P.** (1991).

Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **88**, 11110-11114.

173. **Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1992).

Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein.

Science **256**, 385-387.

174. **Preston, G.M., Jung, J.S., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1993).

The mercury-sensitive residue at cysteine-189 in the CHIP28 water channel.

Journal Of Biological Chemistry **268**, 17-20.

175. **Preston, G.M., Jung, J.S., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1994a).

Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis.

J Biol Chem **269**, 1668-1673.

176. **Preston, G.M., Smith, B.L., Zeidel, M.L., Moulds, J.J. et Agre, P.** (1994b).

Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels.

Science **265**, 1585-1587.

177. **Raina, S., Preston, G.M., Guggino, W.B. et Agre, P.** (1995).
Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues.
J Biol Chem **270**, 1908-1912.
178. **Rao, Y., Jan, L.Y. et Jan, Y.N.** (1990).
Similarity of the product of the *Drosophila* neurogenic gene big brain to transmembrane channel proteins.
Nature **345**, 163-167.
179. **Rash, J.E. et Ellisman, M.H.** (1974).
Studies of excitable membranes. I. Macromolecular specializations of the neuromuscular junction and the nonjunctional sarcolemma.
J Cell Biol **63**, 567-586.
180. **Rash, J.E., Yasumura, T., Hudson, C.S., Agre, P. et Nielsen, S.** (1998).
Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord.
Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 11981-11986.
181. **Ray, K., Hauschild, B.C., Steinbach, P.J., Goldsmith, P.K., Hauache, O. et Spiegel, A.M.** (1999).
Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric ca(2+) receptor.
J Biol Chem **274**, 27642-27650.
182. **Ringler, P., Borgnia, M.J., Stahlberg, H., Maloney, P.C., Agre, P. et Engel, A.** (1999).
Structure of the water channel AqpZ from *Escherichia coli* revealed by electron crystallography.
J Mol Biol **291**, 1181-1190.
183. **Rivers, R.L., Dean, R.M., Chandy, G., Hall, J.E., Roberts, D.M. et Zeidel, M.L.** (1997).
Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes.
J Biol Chem **272**, 16256-16261.
184. **Roudier, N., Verbavatz, J.M., Maurel, C., Ripoche, P. et Tacnet, F.** (1998).
Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells.
J Biol Chem **273**, 8407-8412.
185. **Saboori, A.M., Smith, B.L. et Agre, P.** (1988).
Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh(D)-positive and -negative erythrocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A **85**, 4042-4045.
186. **Sansom, M., Kerr, I., Law, R., Davison, L. et Tieleman, D.** (1998).
Membrane protein structure: the domain approach.
Biochem. Soc. Trans. **26**, 509-515.
187. **Sasaki, S., Fushimi, K., Saito, H., Saito, F., Uchida, S., Ishibashi, K., Kuwahara, M., Ikeuchi, T., Inui, K., Nakajima, K. et al.** (1994).
Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct.
J Clin Invest **93**, 1250-1256.
188. **Schaffner, A.R.** (1998).
Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations?
Planta **204**, 131-139.
189. **Scheuring, S., Ringler, P., Borgnia, M., Stahlberg, H., DJ, M.L., Agre, P. et Engel, A.** (1999).
High resolution AFM topographs of the *Escherichia coli* water channel aquaporin Z.
Embo J **18**, 4981-4987.

190. **Schreiber, R., Greger, R., Nitschke, R. et Kunzelmann, K.** (1997).
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes.
Pflugers Arch **434**, 841-847.
191. **Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R. et Kunzelmann, K.** (1999).
The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells.
J Biol Chem **274**, 11811-11816.
192. **Schulte, D.J. et van Hoek, A.N.** (1997).
Functional analysis and association state of water channel (AQP-1) isoforms purified from six mammals.
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **118**, 35-43.
193. **Shen, L., Shrager, P., Girsch, S.J., Donaldson, P.J. et Peracchia, C.** (1991).
Channel reconstitution in liposomes and planar bilayers with HPLC- purified MIP26 of bovine lens.
J Membr Biol **124**, 21-32.
194. **Shi, L.B., Skach, W.R., Ma, T. et Verkman, A.S.** (1995).
Distinct biogenesis mechanisms for the water channels MIWC and CHIP28 at the endoplasmic reticulum.
Biochemistry **34**, 8250-8256.
195. **Shi, L.B., Skach, W.R. et Verkman, A.S.** (1994).
Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers.
J Biol Chem **269**, 10417-10422.
196. **Shi, L.B. et Verkman, A.S.** (1996).
Selected cysteine point mutations confer mercurial sensitivity to the mercurial-insensitive water channel MIWC/AQP-4.
Biochemistry **35**, 538-544.
197. **Shiels, A. et Bassnett, S.** (1996).
Mutations in the founder of the MIP gene family underlie cataract development in the mouse.
Nat Genet **12**, 212-215.
198. **Shiels, A., Kent, N.A., McHale, M. et Bangham, J.A.** (1988).
Homology of MIP26 to Nod26.
Nucleic Acids Res **16**, 9348.
199. **Shinbo, I., Fushimi, K., Kasahara, M., Yamauchi, K., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1999).
Functional analysis of aquaporin-2 mutants associated with nephrogenic diabetes insipidus by yeast expression.
Am J Physiol **277**, F734-F741.
200. **Skach, W.R., Shi, L.B., Calayag, M.C., Frigeri, A., Lingappa, V.R. et Verkman, A.S.** (1994).
Biogenesis and transmembrane topology of the CHIP28 water channel at the endoplasmic reticulum.
J Cell Biol **125**, 803-815.
201. **Smith, B.L. et Agre, P.** (1991).
Erythrocyte M-r 28000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins.
J. Biol. Chem. **266**, 6407-6415.
202. **Smith, B.L., Preston, G.M., Spring, F.A., Anstee, D.J. et Agre, P.** (1994).
Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens.
J Clin Invest **94**, 1043-1049.
203. **Solomon, A.K.** (1968).

Characterization of biological membranes by equivalent pores.

J Gen Physiol **51**, Suppl:335S+.

204. **Solomon, A.K., Chasan, B., Dix, J.A., Lukacovic, M.F., Toon, M.R. et Verkman, A.S.** (1983).

The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes, and water.

Ann. N. Y. Acad. Sci. **414**, 97-124.

205. **Stamer, W.D., Snyder, R.W. et Regan, J.W.** (1996).

Characterization of the transmembrane orientation of aquaporin-1 using antibodies to recombinant fusion proteins.

Biochemistry **35**, 16313-16318.

206. **Tamarappoo, B.K. et Verkman, A.S.** (1998).

Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones.

J Clin Invest **101**, 2257-2267.

207. **Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M. et Hohmann, S.** (1999).

Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation.

Mol Microbiol **31**, 1087-1104.

208. **Tanaka, M., Inase, N., Fushimi, K., Ishibashi, K., Ichioka, M., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1997).

Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line.

Am J Physiol **273**, L1090-1095.

209. **Tao-Cheng, J.H., Bressler, J.P. et Brightman, M.W.** (1992).

Astroglial membrane structure is affected by agents that raise cyclic AMP and by phosphatidylcholine phospholipase C.

J Neurocytol **21**, 458-467.

210. **Terris, J., Ecelbarger, C.A., Nielsen, S. et Knepper, M.A.** (1996).

Long-term regulation of four renal aquaporins in rats.

Am J Physiol **271**, F414-422.

211. **Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U.V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W.B., van Hoek, A.N. et Hediger, M.A.** (1998).

Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel.

J Biol Chem **273**, 24737-24743.

212. **Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. et Hediger, M.** (1999).

Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9.

Am J Physiol **277**, F685-696.

213. **Uchida, S., Sasaki, S., Fushimi, K. et Marumo, F.** (1994).

Isolation of human aquaporin-CD gene.

J Biol Chem **269**, 23451-23455.

214. **Van Hoek, A.N., Hom, M.L., Luthjens, L.H., De Jong, M.D., Dempster, J.A. et Van Os, C.H.** (1991).

Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation.

J. Biol. Chem. **266**, 16633-16635.

215. **Van Hoek, A.N. et Verkman, A.S.** (1992).

Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28.

J. Biol. Chem. **267**, 18267-18269.

216. **Van Hoek, A.N., Wiener, M., Bicknese, S., Miercke, L., Biwersi, J. et Verkman, A.S.** (1993).
Secondary structure analysis of purified functional CHIP28 water channels by CD and FTIR spectroscopy.
Biochemistry **32**, 11847-11856.
217. **van Hoek, A.N., Wiener, M.C., Verbavatz, J.M., Brown, D., Lipniunas, P.H., Townsend, R.R. et Verkman, A.S.** (1995).
Purification and structure-function analysis of native, PNGase F- treated, and endo-beta-galactosidase-treated CHIP28 water channels.
Biochemistry **34**, 2212-2219.
218. **van Hoek, A.N., Yang, B., Kirmiz, S. et Brown, D.** (1998).
Freeze-fracture analysis of plasma membranes of CHO cells stably expressing aquaporins 1-5.
J Membr Biol **165**, 243-254.
219. **van Lieburg, A.F., Verdijk, M.A., Knoers, V.V., van Essen, A.J., Proesmans, W., Mallmann, R., Monnens, L.A., van Oost, B.A., van Os, C.H. et Deen, P.M.** (1994).
Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene.
Am J Hum Genet **55**, 648-652.
220. **Vargas-Poussou, R., Forestier, L., Dautzenberg, M.D., Niaudet, P., Dechaux, M. et Antignac, C.** (1997).
Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus.
J Am Soc Nephrol **8**, 1855-1862.
221. **Verbavatz, J.M., Brown, D., Sabolic, I., Valenti, G., Ausiello, D.A., Van Hoek, A.N., Ma, T. et Verkman, A.S.** (1993).
Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study.
J Cell Biol **123**, 605-618.
222. **Verbavatz, J.M., Van Hoek, A.N., Ma, T., Sabolic, I., Valenti, G., Ellisman, M.H., Ausiello, D.A., Verkman, A.S. et Brown, D.** (1994).
A 28 kDa sarcolemmal antigen in kidney principal cell basolateral membranes: relationship to orthogonal arrays and MIP26.
J Cell Sci **107**, 1083-1094.
223. **Verkman, A.S.** (1999).
Lessons on renal physiology from transgenic mice lacking aquaporin water channels.
J Am Soc Nephrol **10**, 1126-1135.
224. **Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J.B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B.L., Agre, P. et Engel, A.** (1997).
The three-dimensional structure of aquaporin-1.
Nature **387**, 624-627.
225. **Walz, T., Smith, B.L., Agre, P. et Engel, A.** (1994a).
The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP.
Embo J **13**, 2985-2993.
226. **Walz, T., Smith, B.L., Zeidel, M.L., Engel, A. et Agre, P.** (1994b).
Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP.
J Biol Chem **269**, 1583-1586.
227. **Walz, T., Tittmann, P., Fuchs, K.H., Muller, D.J., Smith, B.L., Agre, P., Gross, H. et Engel, A.** (1996).

Surface topographies at subnanometer-resolution reveal asymmetry and sidedness of aquaporin-1.
J Mol Biol **264**, 907-918.

228. **Walz, T., Typke, D., Smith, B.L., Agre, P. et Engel, A.** (1995).
Projection map of aquaporin-1 determined by electron crystallography.
Nat Struct Biol **2**, 730-732.

229. **Weaver, C.D. et Roberts, D.M.** (1992).
Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules.
Biochemistry **31**, 8954-8959.

230. **Weig, A., Deswarte, C. et Chrispeels, M.J.** (1997).
The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group.
Plant Physiol **114**, 1347-1357.

231. **Wistow, G.J., Pisano, M.M. et Chepelinsky, A.B.** (1991).
Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins.
Trends Biochem Sci **16**, 170-171.

232. **Wolburg, H.** (1995).
Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes.
J Hirnforsch **36**, 239-258.

233. **Yamauchi, K., Fushimi, K., Yamashita, Y., Shinbo, I., Sasaki, S. et Marumo, F.** (1999).
Effects of missense mutations on rat aquaporin-2 in LLC-PK1 porcine kidney cells.
Kidney Int **56**, 164-171.

234. **Yang, B., Brown, D. et Verkman, A.S.** (1996).
The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells.
J Biol Chem **271**, 4577-4580.

235. **Yang, B., Folkesson, H.G., Yang, J., Matthay, M.A., Ma, T. et Verkman, A.S.** (1999a).
Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice.
Am J Physiol **276**, C76-81.

236. **Yang, B., Ma, T. et Verkman, A.S.** (1995).
cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units.
J Biol Chem **270**, 22907-22913.

237. **Yang, B., Ma, T., Xu, Z. et Verkman, A.S.** (1999b).
cDNA and genomic cloning of mouse aquaporin-2: functional analysis of an orthologous mutant causing nephrogenic diabetes insipidus.
Genomics **57**, 79-83.

238. **Yang, B., van Hoek, A.N. et Verkman, A.S.** (1997).
Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4.
Biochemistry **36**, 7625-7632.

239. **Yang, B. et Verkman, A.S.** (1997).
Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes.
J Biol Chem **272**, 16140-16146.

240. **Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T., Nielsen, S., Guggino, W. et Agre, P.** (1999a).
Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin.
Nature **402**, 184-187.
241. **Yasui, M., Kwon, T.H., Knepper, M.A., Nielsen, S. et Agre, P.** (1999b).
Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia.
Proc Natl Acad Sci U S A **96**, 5808-5813.
242. **Yool, A.J., Stamer, W.D. et Regan, J.W.** (1996).
Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels.
Science **273**, 1216-1218.
243. **Zampighi, G., Simon, S.A., Robertson, J.D., McIntosh, T.J. et Costello, M.J.** (1982).
On the structural organization of isolated bovine lens fiber junctions.
J Cell Biol **93**, 175-189.
244. **Zampighi, G.A., Hall, J.E., Ehring, G.R. et Simon, S.A.** (1989).
The structural organization and protein composition of lens fiber junctions.
J Cell Biol **108**, 2255-2275.
245. **Zampighi, G.A., Kreman, M., Boorer, K.J., Loo, D.D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J.E. et Wright, E.M.** (1995).
A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes.
J Membr Biol **148**, 65-78.
246. **Zeidel, M.L., Ambudkar, S.V., Smith, B.L. et Agre, P.** (1992).
Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein.
Biochemistry **31**, 7436-7440.
247. **Zeidel, M.L., Nielsen, S., Smith, B.L., Ambudkar, S.V., Maunsbach, A.B. et Agre, P.** (1994).
Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes.
Biochemistry **33**, 1606-1615.
248. **Zeuthen, T.** (1994).
Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*.
J Physiol (Lond) **478**, 203-219.
249. **Zeuthen, T., Hamann, S. et la Cour, M.** (1996).
Cotransport of H⁺, lactate and H₂O by membrane proteins in retinal pigment epithelium of bullfrog.
J Physiol (Lond) **497**, 3-17.
250. **Zeuthen, T. et Klaerke, D.A.** (1999).
Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺.
J Biol Chem **274**, 21631-21636.
251. **Zhang, R., Logee, K.A. et Verkman, A.S.** (1990).
Expression of messenger RNA coding for kidney and red cell water channels in *Xenopus* oocytes.
J. Biol. Chem. **265**, 15375-15378.
252. **Zhang, R., Skach, W., Hasegawa, H., van Hoek, A.N. et Verkman, A.S.** (1993a).
Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28.
J Cell Biol **120**, 359-369.

253. **Zhang, R., van Hoek, A.N., Biwersi, J. et Verkman, A.S.** (1993b).
A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k.
Biochemistry **32**, 2938-2941.

**ANNEXE I. DISTRIBUTION TISSULAIRE DES PROTEINES MIPS
CHEZ LES MAMMIFERES**

			Cerveau	Cœur	Colon	Estomac	Foiie	Glandes lacrymales	Glandes salivaires	Globules rouges	Intestin	Muscle squelettique	OEil	Pancreas	Poumon	Rein	Testicule	Tissu adipeux	Vessie
AQUAPORINES	AQP0	+					G						G						
	AQP1	+	U	U			C	R	A			U			C, U, M	A, C			
	AQP2	+					F				F			F	F	F	F		F
	AQP4	+	D		D		D				D	E			D, M	D			
	AQP5	+						V					V		V, M				
	AQP6	+	S	S			S					S		S	S	S, Y			
AQUAGLYCE-ROPORINES	AQP8	+	T	T	T, O, P	T	K, T, O	K, O			P	K, P, S	O, T	O, T	T	T	K, T		
		-	K, O, P	K, O, P	K	O	P				T		P	P	K, O, P	K, O, P	P		
	AQP3	+	B, H, I	B, H, I	D, H, I	H	I		W		H, I	B	D	I	H, I, M	B, D, H	B	I	H
		-					B, D, H				D			H	B		J, L	L	
	AQP7	+		J	L		J				L	J			J, L	J, L	J, L	L	L
AQP9	+	N, X	Q	Q	N, X	N, X	N, X				Q	N, Q, X			N	Q	N, X	Q	
	-	Q	N, X	N, X	N, X	N, X	Q				N, X				Q, X	N, X			

Références:

A: (Denker et al., 1988) (WB)
B: (Echevarria et al., 1994) (NB)
C: (Folkesson et al., 1994) (WB, NB)
D: (Frigeri et al., 1995) (IH)
E: (Frigeri et al., 1998) (IF, WB)
F: (Fushimi et al., 1993) (NB)
G: (Gorin et al., 1984) (NB)
H: (Ishibashi et al., 1994) (NB)
I: (Ishibashi et al., 1995) (NB)
J: (Ishibashi et al., 1997a) (NB)
K: (Ishibashi et al., 1997b) (NB)
L: (Ishibashi et al., 1998b) (NB)
M: (King et al., 1997) (WB)

N: (Ko et al., 1999) (NB)
O: (Koyama et al., 1997) (NB, HIS)
P: (Koyama et al., 1998) (NB)
Q: (Kuriyama et al., 1997) (NB)
R: (Li et al., 1994) (NB, WB, IH)
S: (Ma et al., 1996a) (NB)
T: (Ma et al., 1997) (SB)
U: (Nielsen et al., 1993) (WB, IH)
V: (Raina et al., 1995) (NB)
W: (Roudier et al., 1998) (WB)
X: (Tsukaguchi et al., 1998) (NB)
Y: (Yasui et al., 1999b) (WB)

HIS: Hybrydation *in situ*

IF: Immunofluorescence

IH: Immunohistochimie

NB: Northern-blot

SB: Southern-blot

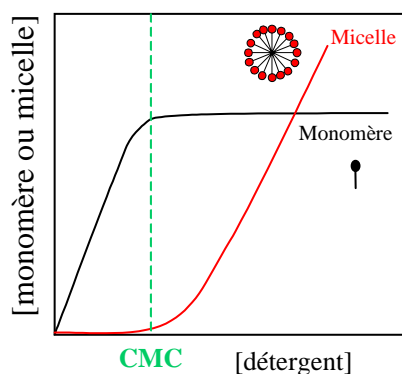
WB: Western-blot

ANNEXE II. SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES

Les détergents sont des molécules amphiphiles comme les lipides. La caractéristique principale des détergents est de former des micelles au-delà d'une certaine concentration (la concentration micellaire critique ou CMC), alors que les lipides forment des vésicules dans les mêmes conditions. En dessous de la CMC, les détergents sont sous forme de monomères en solution. Au-dessus de la CMC, l'excès de détergents forme des micelles.

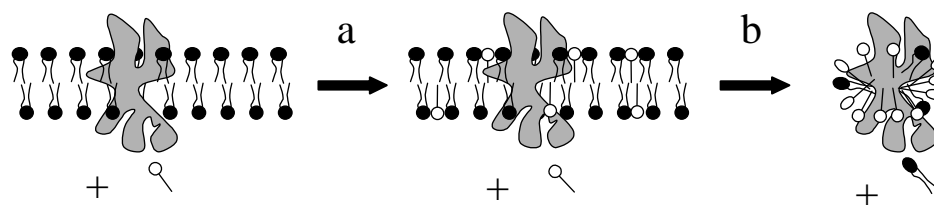
Les détergents utilisés dans la biochimie des protéines membranaires se classent en 4 catégories: les détergents ioniques, non ioniques, zwitterioniques et les sels biliaires. Plus un détergent est polaire, plus il est soluble et plus ils possèdent une CMC élevée. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Concentrations monomérique et micellaire de détergent en fonction de la concentration totale de détergent.



Les détergents ioniques se fixent sur toutes les protéines alors que les détergents non dénaturants ne se fixent que sur les protéines membranaires par l'intermédiaire de leur partie hydrophobe sur la partie hydrophobe de la protéine.

Etapes de solubilisation d'une protéine membranaire



Les molécules de détergents prennent progressivement la place des lipides. Aux faibles concentrations de détergents, ceux-là s'incorporent dans la bicouche lipidique. Au voisinage de la CMC, il y a solubilisation de la membrane c'est à dire formation de micelles mixtes lipides/détergents contenant les protéines. L'addition supplémentaire de détergents conduit à une délipidation progressive de la protéine qui n'est pas toujours totale.

Propriétés de certains détergents.

Détergents	MM mono- mère	<i>n</i>	MM micelle	CMC (M)	Dénatu- ration
Ionique					
Dodécyl sulfate de sodium (SDS) -	288	60	17000	$8 \cdot 10^{-3}$	Oui
N-Lauroyl sarcosine (NLS) -					Non
Non-ioniques					
Polyoxyéthylène-octylphénol (Triton)	646	73	47000	$3 \cdot 10^{-4}$	Non
Octyl-glucoside	292	30	9000	$2 \cdot 10^{-2}$	Non
Dodécyl-maltoside	528	12 7	67000	$2 \cdot 10^{-4}$	Non
Zwiterioniques					
Lysophosphatidylcholine	495	18 5	92000	$7 \cdot 10^{-6}$	Oui
Sels biliaires					
Cholate de sodium	430	10	4300	$1 \cdot 10^{-2}$	Non

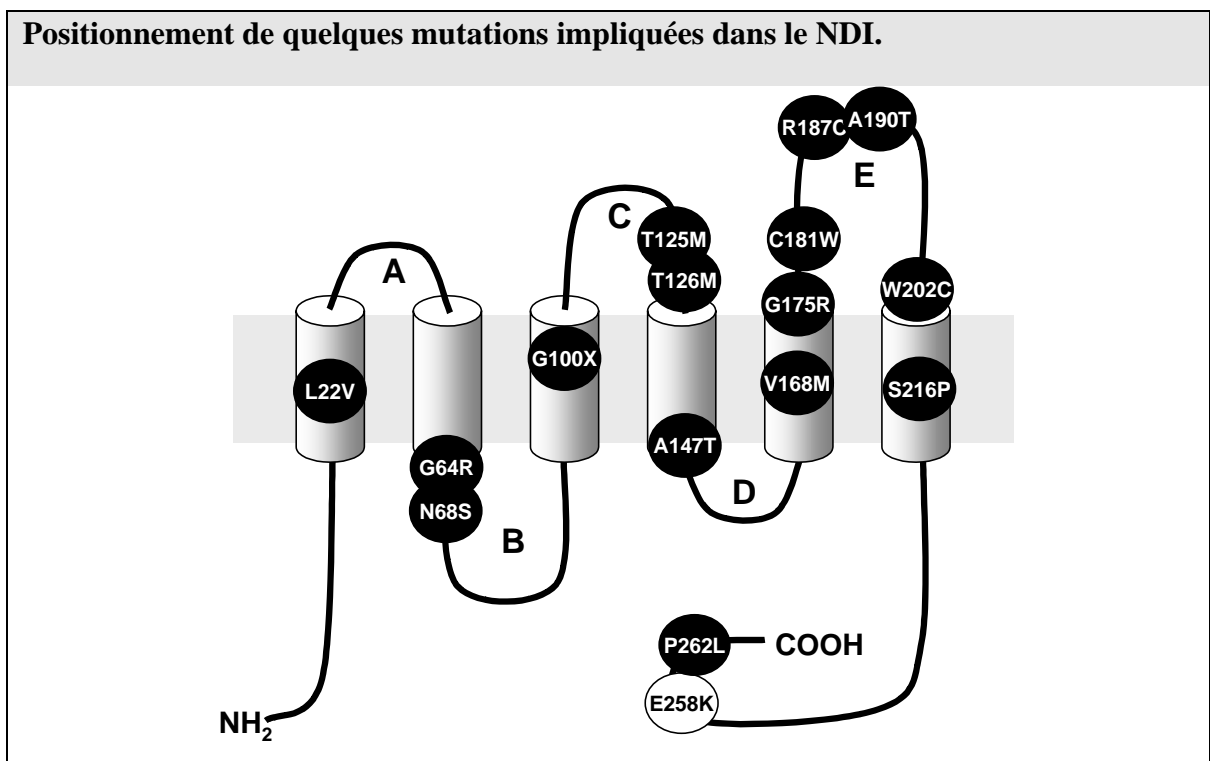
Les valeurs indiquées sont celles en absence de sel. *n* = nombre de molécules de détergents par micelle. D'après E. Shechter.

ANNEXE III. PATHOPHYSIOLOGIE DES CANAUX HYDRIQUES

Certaines protéines MIP sont impliquées dans des pathologies (King et Agre, 1996); Lorsqu'elles sont mutées, elles aboutissent à divers phénotypes: la formation de cataractes (AQP0, (Shiels et Bassnett, 1996)), la perte de l'antigène Colton (AQP1, voir annexe IV), le diabète néphrogénique insipide (AQP2, voir ci-dessous). Pour mieux définir le rôle physiologique des canaux hydriques, la génération de souris transgéniques ("knock-out") a commencé depuis peu. Des souris dont les gènes **AQP1**, **AQP4** ou **AQP5** ont été générées (Ma *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999a). Des défauts fonctionnels ont été décrits au niveau rénal et dans d'autres organes (Verkman, 1999) et la génération de souris "knock-out" pour le gène d'**AQP3** a débuté depuis 1998 (Ma *et al.*, 1998).

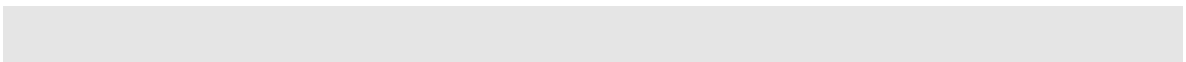
Le diabète insipide est généralement dû à un déficit en hormone antidiurétique. Cette hormone augmente normalement la réabsorption de l'eau par les reins et permet de maintenir une dilution constante du sang. Il existe également quelques cas rares d'une variété de diabète insipide, dit néphrogène, dû à une insensibilité des reins à l'hormone antidiurétique, sécrétée de façon normale. Ceci est provoqué soit par des mutations dans le récepteur V2 à la vasopressine (une soixantaine connue) ou bien par des mutations dans le gène codant pour AQP2 (Deen *et al.*, 1994; Hochberg *et al.*, 1997; Mulders *et al.*, 1998a; Mulders *et al.*, 1997a; van Lieburg *et al.*, 1994). L'eau n'est alors plus réabsorbée, ce qui produit l'évacuation d'un très grand volume d'urine diluée. Un patient atteint de cette maladie peut éliminer entre 5 et 20 litres d'urine par jour, à condition que cette émission soit compensée par une absorption équivalente d'eau. Si la quantité d'eau absorbée n'est pas suffisante, des symptômes de déshydratation apparaissent, entraînant confusion mentale, obnubilation et coma. Le diabète insipide est traité par l'administration d'une hormone antidiurétique de synthèse mais elle est inefficace dans le cas du diabète insipide néphrogène.

La figure ci-dessous représente quelques mutations connues dans l'aquaporine-2 humaine. Des études d'expression fonctionnelles ont montré que les mutations connues de l'AQP2 causaient une rétention de la protéine dans la cellule ou un défaut de sa fonction. On y observe que la localisation des résidus mutés ne se restreint pas à une partie de la protéine.



Les mutations sont responsables de formes autosomiques récessives: G64R, R187C (Deen *et al.*, 1994; van Lieburg *et al.*, 1994), V168M, S216P (Vargas-Poussou *et al.*, 1997), T125M, G175R (Goji *et al.*, 1998), A147T, T126M, N68S (Mulders *et al.*, 1997a), G100X (Hochberg *et al.*, 1997), L22V, C181W (Canfield *et al.*, 1997), W202C (Oksche *et al.*, 1996), A190T, P262L (Kuwahara, 1998), mais il a été trouvé récemment une forme autosomique dominante: E258K (Mulders *et al.*, 1998a) représentée en blanc.

Le tableau montre le défaut attribué à chaque mutation responsable de NDI. La majorité des mutations produisent un défaut d'adressage de la protéine lorsqu'elle est surexprimée dans les ovocytes, dans certaines lignées cellulaires ou dans la levure. Quelques auteurs ont pu mesurer la perméabilité hydrique unitaire des protéines mutées d'après leur taux d'expression à la membrane. Ceci a permis de déterminer si la protéine était fonctionnelle ou non (voir tableau). On remarque que les mutations provoquant un défaut fonctionnel de la protéine (G64R, N68S, T125M, G175R, R187C et E258K) sont situées dans les boucles B, C et E et dans l'extrémité C-terminale. Ce sont dans ces parties que l'on trouve de grandes différences entre les aquaporines strictes et les aquaglycéroporines et transporteurs de glycérol.



Les mutations d'AQP2 impliquées dans un défaut d'adressage ou de fonction

Mutation NDI	Défaut d'adressage		Défaut fonctionnel	
	Réf. (système d'expression)		Réf. (système d'expression)	
L22V	Oui	A, I (ovocytes) G (levure)	Oui	
	Non		Non	A, I (ovocytes)
G64R	Oui	B, E (ovocytes)	Oui	B, E (ovocytes)
	Non		Non	
N68S	Oui	E (ovocytes)	Oui	E (ovocytes) G (levure)
	Non		Non	
T125M	Oui		Oui	C, D (ovocytes) G (levure)
	Non	C, D (ovocytes)	Non	
T126M	Oui	E (ovocytes) I (CHO)	Oui	G (levure)
	Non		Non	E, I (ovocytes)
A147T	Oui	E (ovocytes) I (CHO)	Oui	I (LLCPK1) G (levure)
	Non	I (LLCPK1)	Non	E, I (ovocytes)
G175R	Oui		Oui	C, D (ovocytes)
	Non	C, D (ovocytes)	Non	
C181W	Oui	I (ovocytes) A, I (CHO)	Oui	G (levure)
	Non		Non	
R187C	Oui	B (ovocytes) I (CHO) I (LLCPK1)	Oui	E, I (ovocytes) G (levure)
	Non		Non	
A190T	Oui	D (ovocytes)	Oui	
	Non		Non	
S216P	Oui	B (ovocytes) I (LLCPK1)	Oui	G (levure)
	Non		Non	
E258K	Oui	F (ovocytes)	Oui	F (ovocytes)
	Non		Non	
P262L	Oui	D (ovocytes) G (levure)	Oui	
	Non		Non	

A: (Canfield *et al.*, 1997)B: (Deen *et al.*, 1995)C: (Goji *et al.*, 1998)

D: (Kuwahara, 1998)

E: (Mulders *et al.*, 1997a)F: (Mulders *et al.*, 1998a)G: (Shinbo *et al.*, 1999)

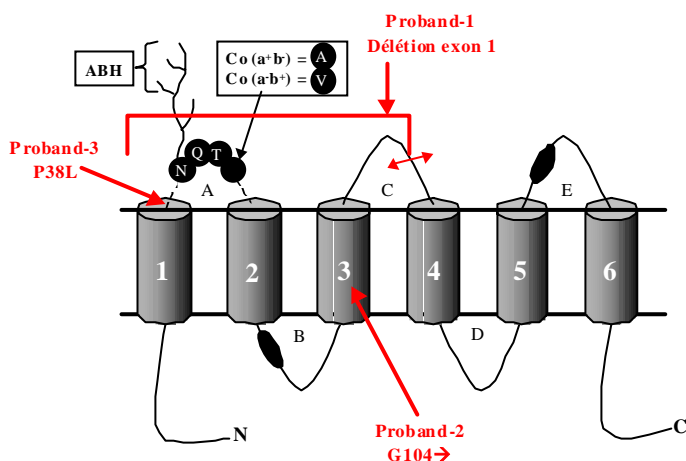
H: (Tamarappoo et Verkman, 1998)

I: (Yamauchi *et al.*, 1999)

ANNEXE IV. LE PHENOTYPE COLTON

Les antigènes de groupe sanguin sont attribués à des domaines structuraux variables présents sur les protéines membranaires tels qu'une substitution d'acide aminé, la présence d'un monosaccharide altéré dans les carbohydrates ou même la juxtaposition de deux protéines membranaires. Environ 250 antigènes ont été décrits et font partie de 22 groupes sanguins différents. L'identité moléculaire de nombreux antigènes de groupes sanguins restait encore inconnue comme par exemple les antigènes Co^a et Co^b qui aboutissent aux trois phénotypes les plus fréquents: 91,4% $Co(a^+b^-)$, 8,4% $Co(a^+b^+)$, 0,2% $Co(a^-b^+)$. Le phénotype $Co(a^-b^-)$ est extrêmement rare et a été décrit chez quelques individus (Lacey *et al.*, 1986).

Sites antigéniques et sites de mutation chez les individus "colton-négatif".



Le site du polymorphisme Colton au résidu 45 est représenté: Co^a = alanine (A) et Co^b = valine (V). Le polylactosaminoglycane attaché au résidu asparagine 42 forme l'antigène ABH. Les 3 sites de mutation $Co(a^+b^-)$ connus sont représentés en rouge (d'après Preston *et al.*, Science, 1994).

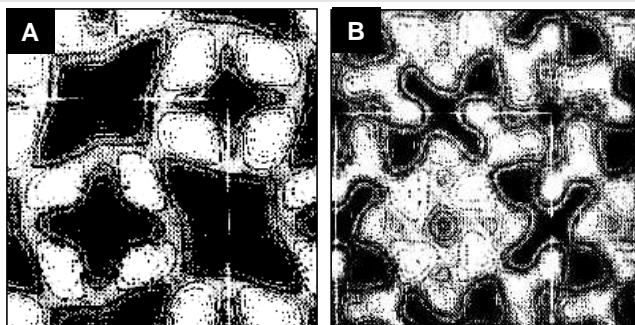
La présence abondante d'AQP1 dans le globule rouge à laquelle aucun antigène de groupe sanguin n'est associé, qui présente des polylactosaminoglycanes, présents également sur la bande 3, et dont le locus génomique est situé sur le même chromosome que celui du groupe sanguin Colton laissait penser que l'antigène Colton pouvait être associé à AQP1. Effectivement, les travaux de Smith et Agre ont montré qu'AQP1 portait en elle au moins deux antigènes différents: le polylactosaminoglycane est responsable de l'antigène ABH et le résidu 45 est responsable d'un polymorphisme où une alanine est présente dans l'aquaporine des individus Co (a^+b^-) et une valine est présente chez les individus (a^-b^+). Ce résidu 45 situé donc sur la face externe est un élément supplémentaire à prendre en compte pour la topologie membranaire de cette protéine. De plus, AQP1 n'est pas détectée en western-blot dans les globules rouges des rares individus Co (a^-b^-) (Smith *et al.*, 1994).

La perméabilité hydrique des globules rouges des individus Colton (a^-b^-) indique qu'elle est réduite de 80% par rapport aux témoins, pourtant, ces personnes ne souffrent d'aucune maladie apparente. Parmi ces individus, il a été identifié trois cas différents d'après l'analyse de l'ADN génomique: une délétion à l'intérieur du gène codant pour AQP1, une insertion de base provoquant un décalage du cadre de lecture à partir de la glycine 104, et une substitution cytosine en thymine induisant une substitution d'une proline par une leucine en position 38 (Preston *et al.*, 1994b). Afin de vérifier la conséquence de la mutation P38L d'AQP1, l'expression et la fonction de cette protéine ont été testées dans l'ovocyte de xénope, aboutissant à une faible perméabilité par rapport à la protéine sauvage et à une absence de glycosylation ainsi qu'une baisse d'expression à la membrane plasmique (Preston *et al.*, 1994b).

ANNEXE V. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES OBTENUS SUR DES CRISTAUX D'AQP1

Des cartes de projection de cristaux d'AQP1 à deux dimensions en coloration négative ne montrent presque pas de différence au niveau des tétramères adjacents alors qu'en ombrage rotatif, les deux tétramères montrent une structure différente correspondant à une orientation inversée dans la membrane (Walz *et al.*, 1996) (figure ci-dessous).

Comparaison des cartes de projection bidimensionnelles d'AQP1 obtenues à partir de deux techniques différentes.



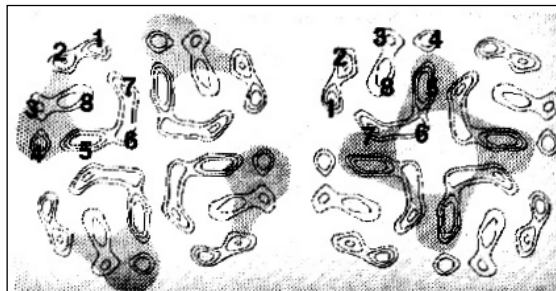
Walz *et al.*, 1996

Les cartes de projection à deux dimensions ont été obtenues en coloration négative (A) ou en ombrage rotatif (B).

Par des techniques d'ombrage de métaux lourds et de microscopie à force atomique (AFM), il a été possible d'identifier le côté cytosolique du tétramère dans un cristal à deux dimensions en comparant le relief de surface de cristaux digérés ou non à la carboxypeptidase Y connue pour cliver la partie C-terminale d'AQP1 de 5 kDa. Le relief des faces extracellulaire et cytoplasmique se révèle être différent. La figure ci-dessous montre la carte de projection de cristaux d'AQP1 2D obtenue à 6 Å de résolution (Walz *et al.*, 1995) sur lesquelles ont été ajoutées les zones extra membranaires à forte densité de la

bicouche lipidique sur la face extracellulaire et cytoplasmique. Ces zones indiquent une asymétrie de la protéine de part et d'autre de la bicouche lipidique (Walz *et al.*, 1996).

Cartes de projection bidimensionnelle d'AQP1 montrant les zones extra membranaires.



Walz et al., 1996

Face extracellulaire à gauche et face cytoplasmique à droite.

|

|

ANNEXE VII. LISTE DE REVUES**1999. Agre, P., Mathai, J. C., Smith, B. L. et Preston, G. M.**

Functional analyses of aquaporin water channel proteins.

Methods Enzymol **294**, 550-72.**1999. Beitz, E.**

The mammalian aquaporin water channel family: A promising new drug target.

Curr Med Chem **6**, 457-67.**1999. Chrispeels, M. J., Crawford, N. M. et Schroeder, J. I.**

Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells.

Plant Cell **11**, 661-76.**1999. Marty, F.**

Plant vacuoles.

Plant Cell **11**, 587-600.**1999. Verkman, A. S.**

Lessons on renal physiology from transgenic mice lacking aquaporin water channels.

J Am Soc Nephrol **10**, 1126-35.**1998. Agre, P.**

Aquaporin null phenotypes: the importance of classical physiology.

Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 9061-3.**1998. Agre, P., Bonhivers, M. et Borgnia, M. J.**

The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems.

J Biol Chem **273**, 14659-62.**1998. Deen, P. M. et van Os, C. H.**

Epithelial aquaporins.

Curr Opin Cell Biol **10**, 435-42.**1998. Echevarria, M. et Ilundain, A. A.**

Aquaporins.

J Physiol Biochem **54**, 107-18.**1998. Heymann, J. B., Agre, P. et Engel, A.**

Progress on the structure and function of aquaporin 1.

J Struct Biol **121**, 191-206.**1998. Sasaki, S., Ishibashi, K. et Marumo, F.**

Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct.

Annu Rev Physiol **60**, 199-220.**1998. Schaffner, A. R.**

Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations?

Planta **204**, 131-9.

1998. Verkman, A. S.

Role of aquaporin water channels in kidney and lung.

Am J Med Sci **316**, 310-20.

1998. Yamamoto, T. et Sasaki, S.

Aquaporins in the kidney: emerging new aspects.

Kidney Int **54**, 1041-51.

1997. Fischbarg, J., Kuang, K., Li, J., Iserovich, P. et Wen, Q.

Aquaporins and ion conductance.

Science **275**, 1491-2.

1997. King, L. S., Nielsen, S. et Agre, P.

Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat.

Am J Physiol **273**, C1541-8.

1997. Marinelli, R. A. et LaRusso, N. F.

Aquaporin water channels in liver: their significance in bile formation.

Hepatology **26**, 1081-4.

1997. Nielsen, S., King, L. S., Christensen, B. M. et Agre, P.

Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat.

Am J Physiol **273**, C1549-61.

1997. Verkman, A. S. et Yang, B.

Aquaporins and ion conductance.

Science **275**, 1491.

1996. Benoit, E., Méry, P. F., Tacnet, F. et Tell, F.

Histoires d'aquaporines: des canaux qui font couler beaucoup d'eau.

Med. Sci. **6**, 789-794.

1996. Bichet, D. G.

Vasopressin receptors in health and disease.

Kidney Int **49**, 1706-11.

1996. Bichet, D. G.

Pathological aspects of water transport in the collecting ducts.

Nephrologie **17**, 417-22.

1996. Hays, R. M.

Cellular and molecular events in the action of antidiuretic hormone.

Kidney Int **49**, 1700-5.

1996. Knepper, M. A., Wade, J. B., Terris, J., Ecelbarger, C. A., Marples, D., Mandon, B., Chou, C. L., Kishore, B. K. et Nielsen, S.

Renal aquaporins.

Kidney Int **49**, 1712-7.

1996. Nielsen, S.

Aquaporin water channels in the kidney: localization and regulation.

Perit Dial Int **16 Suppl 1**, S25-7.

1996. Nielsen, S., Marples, D., Frokiaer, J., Knepper, M. et Agre, P.

The aquaporin family of water channels in kidney: an update on physiology and pathophysiology of aquaporin-2.

Kidney Int **49**, 1718-23.

1996. Park, J. H. et Saier, M. H., Jr.

Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins.

J Membr Biol **153**, 171-80.

1996. Verkman, A. S., van Hoek, A. N., Ma, T., Frigeri, A., Skach, W. R., Mitra, A., Tamarappoo, B. K. et Farinas, J.

Water transport across mammalian cell membranes.

Am J Physiol **270**, C12-30.

1995. Agre, P., Brown, D. et Nielsen, S.

Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies.

Curr Opin Cell Biol **7**, 472-83.

1995. André, B.

An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast **11**, 1575-611.

1995. Fischbarg, J.

A rapidly emerging field: water channel proteins in the eye.

Invest Ophthalmol Vis Sci **36**, 758-63.

1995. Fischbarg, J. et Vera, J. C.

Multifunctional transporter models: lessons from the transport of water, sugars, and ring compounds by GLUTs.

Am J Physiol **268**, C1077-89.

1995. Fushimi, K. et Marumo, F.

Water channels.

Curr Opin Nephrol Hypertens **4**, 392-7.

1995. Jo, I. et Harris, H. W., Jr.

Molecular mechanisms for the regulation of water transport in amphibian epithelia by antidiuretic hormone.

Kidney Int **48**, 1088-96.

1995. Nielsen, S. et Agre, P.

The aquaporin family of water channels in kidney.

Kidney Int **48**, 1057-68.

1995. Sasaki, S., Fushimi, K., Ishibashi, K. et Marumo, F.

Water channels in the kidney collecting duct.

Kidney Int **48**, 1082-7.

1995. Verkman, A. S., Shi, L. B., Frigeri, A., Hasegawa, H., Farinas, J., Mitra, A., Skach, W., Brown, D., Van Hoek, A. N. et Ma, T.

Structure and function of kidney water channels.

Kidney Int **48**, 1069-81.

1994. Chrispeels, M. J. et Agre, P.

Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells.
Trends Biochem Sci **19**, 421-5.

1994. Knepper, M. A.

The aquaporin family of molecular water channels.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 6255-8.

1994. van Os, C. H., Deen, P. M. et Dempster, J. A.

Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution.
Biochim Biophys Acta **1197**, 291-309.

1993. Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. et Nielsen, S.

Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel.
Am. J. Physiol. **265**, F463-76.

1993. Agre, P., Sasaki, S. et Chrispeels, M. J.

Aquaporins: a family of water channel proteins.
Am J Physiol **265**, F461.

1991. Pao, G. M., Wu, L. F., Johson, K. D., Hofte, H., Chrisppels, M. J., Sweet, G., Sandal, N. N. et Saer, M. H. J.

Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins.
Molecular Microbiol. **5**, 33-37.

<i>ANNEXE VIII.</i> PUBLICATIONS

RESUME

La famille des protéines MIPs est composée de canaux hydriques et de facilitateurs de glycérol. Parmi les canaux hydriques, certains sont sélectivement perméables à l'eau, les aquaporines (AQP1, AQP2,...), et les autres sont également perméables aux petits solutés comme le glycérol, les aquaglycéroporines, dont AQP3 fait partie.

Nous avons montré dans un premier temps que la perméabilité au glycérol du globule rouge était due à la présence d'AQP3.

Dans l'intention de mieux comprendre quels étaient les éléments protéiques impliqués dans la sélectivité des protéines MIPs, nous avons construits des chimères entre AQP2 et AQP3. L'une d'entre elle, AQP3-AQP2 Cter, après expression dans l'ovocyte de xénope, a permis de montrer que la partie Cterminale est impliquée dans le transport d'eau mais pas dans le transport de glycérol des protéines MIPs.

Nous avons également montré que les ovocytes de xénope non matures possédaient des perméabilités à l'eau et au glycérol supérieures aux ovocytes matures, dû à l'expression d'un canal ou d'un transporteur endogène.

Enfin, nous avons envisagé de déterminer pour la première fois la structure quaternaire d'une aquaglycéroporine: AQP3. Alors qu'AQP1 dévoile sa forme tétramérique sur gradient de saccharose, après solubilisation en conditions non dénaturantes, AQP3 sédimente dans des fractions plus légères sous formes d'un monomère et d'un dimère très résistant au SDS et aux agents réducteurs hydrophiles. Nous n'avons pu conclure quant à son organisation dans les membranes du fait d'une éventuelle sensibilité aux détergents non dénaturants utilisés. Nous avons donc engagé des études de microscopie électronique de cryofractures de membranes d'ovocytes exprimant AQP1 et AQP3. Nous en avons déduit que la taille d'AQP3 n'était pas significativement différente de celle d'AQP1 pour suggérer une organisation membranaire également différente.

Mots clés: AQP3, sélectivité, transport, érythrocyte, oligomérisation.

CARACTERISATION FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DE L'AQUAGLYCEROPORINE AQP3 EXPRIMEE DANS DIVERS SYSTEMES

La famille des protéines MIPs est composée de canaux hydriques et de facilitateurs de glycérol. Parmi les canaux hydriques, certains sont sélectivement perméables à l'eau, les aquaporines (AQP1, AQP2,...), et les autres sont également perméables aux petits solutés comme le glycérol: les aquaglycéroporines, dont AQP3 fait partie. Nous avons montré dans un premier temps que la perméabilité au glycérol du globule rouge était due à la présence d'AQP3. Dans l'intention de mieux connaître quels étaient les éléments protéiques impliqués dans la sélectivité des protéines MIPs, nous avons construit des chimères entre AQP2 et AQP3. L'une d'entre elle, AQP3-AQP2 Cter, après expression dans l'ovocyte de Xénope, a permis de montrer que la partie C terminale cytoplasmique est impliquée dans le transport d'eau mais pas dans le transport de glycérol d'AQP3. Nous avons également montré que les ovocytes de xénope non matures possédaient des perméabilités à l'eau et au glycérol supérieures à celles des ovocytes matures suggérant l'expression d'un canal ou d'un transporteur endogène. Enfin, nous avons envisagé de déterminer pour la première fois la structure quaternaire d'une aquaglycéroporine: AQP3. Alors qu'AQP1 dévoile sa forme tétramérique sur gradient de saccharose, après solubilisation en conditions non dénaturantes, AQP3 sédimente dans des fractions plus légères sous forme d'un monomère et d'un dimère très résistant au SDS et aux agents réducteurs hydrophiles. Nous n'avons pu conclure quant à son organisation dans les membranes du fait de son éventuelle sensibilité spécifique aux détergents non dénaturants utilisés. Nous avons donc engagé des études de microscopie électronique de cryofractures de membranes d'ovocytes exprimant AQP1 et AQP3. Nous en avons déduit que la taille d'AQP3 n'était pas suffisamment différente de celle d'AQP1 pour suggérer une organisation membranaire également différente.

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE AQUAGLYCERPORIN AQP3 EXPRESSED IN VARIOUS SYSTEMS.

Proteins of the MIP family are membrane proteins that facilitate water or/and solute transport across biological membranes. The members of this family have been classified in three subgroups according to their sequence similarity and function: the aquaporins contains water selective transport proteins (AQP1, AQP2,...), the aquaglyceroporins are water and solute permeable proteins such as AQP3, and the glycerol facilitators are impermeable to water. We have shown that the glycerol permeability of red blood cell membrane is due to the presence of AQP3. In order to determine parts of the proteins involved in the selectivity, we have constructed chimeras between AQP2 and AQP3. Permeability measurements of oocyte expressing AQP3-AQP2 Cter showed that the C terminal extremity is critical for the transport of water but not for the glycerol one. Comparing the water and glycerol transports of oocytes at various stages of maturation, we have shown that an endogenous channel or transporter was present in immature oocytes. Our interest was then focused on the determination of the oligomerization status of an aquaglyceroporin: AQP3, in different membranes. The known tetrameric structure of AQP1 was observed by velocity sedimentation on sucrose gradient, in contrast, AQP3 was found in much slighter fraction in monomeric and dimeric forms. The dimer seems to be very resistant to SDS and hydrophilic reducing agent treatment. Due to a plausible sensitivity of AQP3 to the non-denaturant detergents used, we could not exclude its tetrameric form in the membrane. The results obtained with electronic microscopy on AQP1 and AQP3 expressing oocyte membrane cryofracture showed that AQP1 and AQP3 IMP sizes were not different enough to suggest another membrane organization.